



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

피나무 (*Tilia amurensis*), 섬피나무
(*Tilia insularis*) 및 찰피나무
(*Tilia mandshurica*) 체세포배
발생 조절 유전자의 탐색과 발현

Detecting and Expression of
Somatic Embryogenesis Regulatory Genes in
Tilia amurensis, *Tilia insularis* and
Tilia mandshurica

2018년 8월

서울대학교 대학원
산림과학부 산림환경학 전공
강 혜 인

피나무 (*Tilia amurensis*), 섬피나무
(*Tilia insularis*) 및 찰피나무
(*Tilia mandshurica*) 체세포배
발생 조절 유전자의 탐색과 발현

지도 교수 강 규 석

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함
2018년 7월

서울대학교 대학원
산림과학부 산림환경학 전공
강 혜 인

강혜인의 농학석사 학위논문을 인준함
2018년 7월

위 원 장 이 우 신 (인)

부위원장 강 규 석 (인)

위 원 김 현 석 (인)

초 록

피나무류(*Tilia* spp.)는 밀원수종이자 조경수로 수요가 많은 반면 낮은 발아율로 인해 육묘가 어렵다. 체세포배는 식물을 기내 배양할 때 표피세포에서 발생하는 배로서, 유도 과정이 단순하고 인공종자로 이용이 가능하여 유용한 임목의 대량증식 방법으로 주목받고 있다. 피나무(*Tilia amurensis* Rupr.)의 체세포배 유도 조건에 관한 연구는 활발히 이루어져 왔지만 유전적인 관점에서는 연구가 이루어지지 않았다. 아직까지도 명확하게 밝혀지지 않은 임목의 체세포배 발생 기작을 연구하는 것은 매우 중요하며, 이를 통해 체세포배 발생을 조절할 수 있다면 피나무 대량생산에 큰 도움이 될 것이다. 따라서 본 연구에서는 섬피나무(*Tilia insularis* Nakai)와 찰피나무(*Tilia mandshurica* Rupr. et Maxim.)가 같은 피나무 속인 피나무 체세포배 유도 조건과 동일한지 알아보았다. 또한 체세포배 발생에 관여한다고 알려진 7개 유전자가 피나무 유전체에 존재하는지 탐색하고, 그로부터 발견된 유전자의 발현량을 측정하였다. 피나무, 섬피나무 및 찰피나무 미성숙 배를 종자로부터 분리해 1.0mg/L의 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 배양하여 체세포배 발생을 관찰하였다. 체세포배를 발생 단계 별로 샘플링하여 totalRNA 추출 및 cDNA 합성을 하였다. 이후 문헌에서 조사된 7개 유전자 프라이머를 이용해 PCR로 DNA 단편을 증폭시켜 시퀀싱하였다. 그 서열을 이용해 디자인한 프라이머로 RT-qPCR을 수행하여 탐색된 유전자의 발현량을 측정하고, 일원분산분석(ANOVA)을 통해 단계 별 발현량의 차이를 비교하였다. 관찰 결과, 피나무와 섬피나무는 체세포배 발생 마지막 단계인 cotyledonary stage까지 발생이 확인되었으며, 찰피나무에서는 globular stage의 체세포배가 유도되는 것이 확인되었다. 유전자 탐색 과정에서 *pTaSERK*, *pTaPICKLE* 및 *pTaVAL1*의 유전자

시퀀스를 얻었다. 이를 BLAST한 결과, 다른 종들의 유전자와 상동인 것으로 나타났고 그 유사성은 분류학적으로 가까운 종에서 높게 나타났다. 단백질 시퀀스를 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 포플러(*Populus trichocarpa*), 코르크 참나무(*Quercus suber*) 및 대두(*Glycine max*)와 비교하였을 때 *SERK* 유전자는 97.1%, *PICKLE* 유전자는 87.6% 그리고 *VAL1* 유전자는 68.8% 유사했다. *pTaSERK*는 세린/트레오닌 인산화효소 도메인, *pTaPICKLE*은 크로모 영역 도메인과 SNF2 유전자군 아미노말단 도메인, *pTaVAL1*은 식물 특이적 B3-DNA 결합 도메인을 가지고 있었다. *pTaSERK*의 발현은 피나무와 섬피나무 모두에서 heart stage에서 높게 나타났다. 피나무에서 *pTaPICKLE*의 발현은 heart stage가 높게 나타났고 torpedo stage에서 낮았다. 섬피나무에서는 모든 단계에서 대조군과 비슷한 수준의 발현을 보였다. *pTaVAL1*의 발현은 피나무의 heart stage와 cotyledonary stage에서 높았고 torpedo stage에서 낮았다. 하지만 섬피나무에서는 모든 단계에서 대조군보다 낮은 발현을 보였다. 또한 체세포배와 비교하기 위해 발아 종자에서 세 유전자의 발현을 보았을 때 모두 대조군과 같거나 낮은 발현을 보였다. 시퀀싱과 발현 분석 결과를 봤을 때, *pTaSERK*, *pTaPICKLE* 및 *pTaVAL1* 유전자는 다른 종의 유전자와 상동성을 보여 유사한 역할을 할 것이라고 추정할 수 있으나, 기존 문헌과 다소 다른 발현 양상을 보여 이 유전자들의 기능에 대한 보완적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

주 요 어 : 피나무(*Tilia amurensis*), 섬피나무(*Tilia insularis*), 찰피나무(*Tilia mandshurica*), 체세포배 발생, 유전자 탐색, 유전자 발현

학 번 : 2016-28580

목 차

제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구의 배경	1
제 2 절 연구의 내용	3
제 2 장 연 구 사	5
제 1 절 피나무 특성 연구	5
제 2 절 체세포배 발생 연구	6
제 3 절 체세포배 유전자 연구	8
제 3 장 재료 및 방법	10
제 1 절 시료 채취 및 배양	10
제 2 절 유전자 탐색	11
제 3 절 발현 분석	14
제 4 장 결 과	15
제 1 절 피나무류 체세포배 유도	15
제 2 절 피나무 체세포배 유전자	17
제 2 절 유전자 발현 분석	25
제 5 장 고 찰	27
제 1 절 피나무 체세포배 유전자	27
제 2 절 유전자 발현 분석	34
인 용 문 헌	38
Appendix 1, 2, 3	46
Abstract	52

표 목차

[Table 1] Primers for gene detecting	13
[Table 2] Primers for expression analysis (real time qPCR)	14
[Table 3] Pairwise alignment	24
[Table 4] Taxonomy information of BLAST species	29

그림 목차

[Figure 1] Regulatory interactions of genes controlling somatic embryogenesis	9
[Figure 2] Somatic embryogenesis results.....	16
[Figure 3] BLAST dendrogram based on alignment similarity scores relative to <i>Tilia amurensis</i> sequence.....	19
[Figure 4] Multiple gene sequence alignment.....	22
[Figure 5] Multiple protein sequence alignment	23
[Figure 6] Relative gene expression of <i>pTaSERK</i> , <i>pTaPICKLE</i> and <i>pTaVAL1</i> during the somatic embryogenesis of <i>Tilia amurensis</i> and <i>Tilia insulgaris</i> , assessed by real time qPCR.....	26
[Figure 7] Protein functional domain	33

제 1 장 서 론

제 1 절 연구의 배경

우리나라의 피나무류(*Tilia* spp.)는 피나무(*Tilia amurensis* Rupr.), 섬피나무(*T. insularis* Nakai), 찰피나무(*T. mandshurica* Rupr. et Maxim.) 등이 있다. 피나무류는 온대·한대 식물로 우리나라 중부 이북의 산지에 분포한다(이덕수, 1995). 우리나라 피나무류는 재질이 우수하여 목재로서 가치가 높고 수형이 아름다워 조경수로도 쓰임이 많다. 또한 여름철 밀원수종으로서 조림 수요가 높다(윤택승 등, 2005; 홍성천, 2002).

피나무는 배의 미숙, 단단한 과피, 수분의 침투가 어려운 종피 등으로 인해 발아율이 매우 낮다. 국립산림품종관리센터의 종자품질기준에 의하면 피나무는 발아율 9%와 효율 8%, 찰피나무는 발아율 16%와 효율 15%을 보인다. 또한 피나무류는 발아에 2~3년이 걸리는 다년형 또는 장기휴면형의 육묘형을 가지고 있다. 이렇듯 낮은 발아율과 다양한 육묘형으로 인해 높은 수요에도 불구하고 피나무류 번식 및 양묘에 어려움을 겪고 있다(홍성천, 2000). 이에 습식 종자 저장을 통해 발아율을 높이는 방안에 대하여 연구가 되었지만 아직까지도 효율적인 양묘법이 개발되지 않은 상황이다(이덕수, 1995). 따라서 밀원 농가에 피나무를 원활하게 공급하여 이용하기 위해서는 대량증식에 대한 연구가 필요하다. 대량증식을 위한 대표적인 방법으로 체세포배 발생을 이용한 조직배양이 있다.

체세포배 발생(somatic embryogenesis)이란 체세포(體細胞, somatic cell)가 탈분화되어 배(胚, embryo)가 될 수 있는 전형성능의

줄기세포가 만들어지는 과정이고, 그 과정에서 만들어진 배를 체세포배(somatic embryo)라고 한다(Guan et al., 2016). 체세포배 발생은 일반적인 조직배양(organogenesis)과 다르게 줄기나 뿌리 등의 기관이 아닌 배를 생산해낼 수 있다. 체세포배는 줄기 및 뿌리 원기(primordia)를 모두 가지는 양극성(biopolar)의 성질을 가졌기 때문에 온전한 식물체를 만들기 위해 줄기와 뿌리를 각각 분화시킬 필요가 없다. 이러한 성질을 이용하여 체세포배를 인공종자로 만들면 일반 종자처럼 저장과 파종이 가능하여 편리한 장점이 있다(김만조, 1987). 또한 체세포배는 모식물의 유전형이나 배수성을 그대로 가지고 있기 때문에 우수한 클론을 보존할 수 있으며 임목과 같이 생활사가 길고 이형접합빈도(heterozygosity)가 큰 식물에 있어서 육종 기간을 단축시킬 수 있다(Horstman et al., 2017).

쌍떡잎식물에서 체세포배의 발달 단계는 globular stage, heart stage, torpedo stage 및 cotyledonary stage로 나누어지는데 이는 접합자배(zygotic embryo)의 발달 단계와 유사하다. 대부분의 식물이 무정형의 배아세포(embryonic cell)에서 체세포배가 발생하는 간접 체세포배 발생을 한다. 하지만 콩(*Glycine max* (L.) Merr.), 옥수수(*Zea mays* L.) 등의 몇몇 식물과 연구대상인 피나무는 표면의 세포가 변형되어 체세포배가 되는 직접 체세포배 발생을 한다. 직접 체세포배 발생은 캘러스(callus) 단계를 거치지 않기 때문에 유도 과정이 단순하고 체세포계 변이의 위험이 적다(Finer, 1995).

체세포배의 발생 원리는 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없다. 특히 임목에서는 체세포배 발생에 대한 연구가 부족하며, 체세포배 발생이 어려운 활엽수에서는 더욱 연구가 미미한 실정이다. 현재 우리나라에서는 일본잎갈나무와 잔털벗나무의 체세포배에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다(이임균 등, 2018).

제 2 절 연구의 내용

피나무의 체세포배 발생을 유도하기 위한 연구는 다수 선행되어 왔다(Kim et al., 2006; 김만조, 1987; 김만조 등, 1990; 김재현 등, 1986). 하지만 섬피나무와 찰피나무에서는 체세포배가 유도된 선례가 없다. 두 종의 체세포배 유도 조건을 확립하고 이를 본 연구에 활용하기 위해서 섬피나무와 찰피나무 시료를 피나무 체세포배와 같은 조건에서 배양하여 관찰할 필요가 있다.

피나무 체세포배 발생에 관련한 문헌은 대부분 배양 조건에 관한 연구이다. 반면에 유전적인 관점에서 피나무 체세포배를 연구한 선행 연구는 없었다. 그 이유는 피나무의 유전체가 거의 분석되어 있지 않기 때문이다. 하지만 체세포배 발생에는 환경적 요인 뿐 아니라 유전적인 요인 또한 영향을 미치기 때문에 체세포배 발생을 효과적으로 조절하기 위해서는 관련 유전자를 연구할 필요가 있다. 피나무 체세포배 발생 조절 유전자의 서열과 역할을 밝히면 이를 기초 자료로 활용하여 체세포배 발생을 조절할 수 있어 피나무류의 대량 증식에 용이할 것이다. 연구 대상의 유전정보가 부족한 경우에는 모델 식물 또는 유연관계가 가까운 종의 유전자 서열을 이용하여 해당 유전자를 증폭시킬 수 있다. 이러한 방법을 통해 다른 종에서 체세포배 발생에 관여한다고 알려진 유전자들이 피나무에 존재하는지 유전자 증폭을 통해 탐색할 필요가 있다.

탐색된 유전자의 기작과 역할을 밝히기 위해서는 유전자의 발현을 분석해야 한다. 탐색된 유전자에 대하여 체세포배 발생 단계 별로 탐색된 유전자의 발현 양을 측정하여 유전자의 기능을 추정하여야 한다.

따라서 본 연구에서는 첫째, 섬피나무와 찰피나무에서도 피나무와 같은 조건에서 체세포배가 발생하는 것을 확인하고 둘째, 피나무 체세포배 발생에 관여하는 유전자를 탐색, 셋째, 체세포배 발달 단계에서 탐색된 유전자의 발현 양상을 분석하고자 한다.

제 2 장 연 구 사

제 1 절 피나무 특성 연구

피나무 속 식물은 미국 동부, 멕시코, 유럽, 서아시아, 동북아시아에 이르는 북반구 온대지방에 분포한다. 피나무(*Tilia amurensis*)는 아무르강 유역에서 처음 보고되었으며 한반도 전체에 분포하고 있다. 섬피나무(*Tilia insularis*)는 울릉도에 자생하는 것으로 알려졌고 찰피나무(*Tilia mandshurica*)는 관악산, 속리산, 설악산, 가리왕산 등에 분포한다(김기중과 정영호, 1986).

피나무류는 번식이 어렵기 때문에 이와 관련한 연구가 주를 이루었다. 특히 피나무 속 수종들에 대한 종자 발아 연구가 다수 있었다(Magherini, 1994; Magherini and Nin, 1992a). 그리고 피나무 종자의 휴면을 타파하고 발아를 촉진하기 위해서 저온 저장을 하는 방법에 대한 연구가 있었지만 4개월 이상의 긴 시간이 요구된다는 한계가 있었다(이덕수, 1995). 마찬가지로 피나무류의 종자 생태를 이해하기 위해 피나무의 발아형과 육묘도에 대한 연구가 있었다(홍성천, 2000).

발아율이 낮은 피나무류의 증식을 용이하게 하기 위하여 삼목번식에 대한 연구가 다수 이루어졌으나 삼목 활착률은 50% 이하로 매우 낮았으며 호르몬을 처리하여도 유의미한 차이가 없거나 근소하게 증가하였다(Magherini, 1994; Magherini and Nin, 1992b; 이돈구와 서민환, 1989; 최문길과 이근수, 1982). 피나무의 육묘를 성공적으로 하기 위한 노력의 일환으로 시비와 용기에 따른 피나무류의 생장에 대한 연구가 진행되었다(윤택승 등, 2005; 조민석 등, 2013a; 조민석 등,

2013b; 황재홍 등, 2013).

피나무가 밀원수종으로서 주목받으면서 피나무 수분과 화분 화밀분비에 대한 연구가 이루어졌다(김문섭 등, 2013; 김문섭 등, 2014). 또한 유전적인 관점에서의 피나무 연구는 엽록체 DNA에 대한 연구와(Fineschi et al., 2003; McCarthy and Mason-Gamer, 2016; 부다운과 박선주, 2016) 피나무 ISSR 마커를 개발하는 연구가 있었다(Liqiang et al., 2006).

제 2 절 체세포배 발생 연구

체세포배 발생은 미나리 속 식물(Five-leaved water-dropwort, *Oenanthe aquatica*)에서 처음으로 관찰되었다(Waris, 1957). 곧바로 당근(*Daucus carot*)의 배양된 세포에서도 체세포배 발생이 연구되면서 그 이후에 다양한 식물에서 체세포배 발생이 연구되기 시작했다(Steward et al., 1958).

체세포배의 발달 단계는 일반적인 배 발생 단계와 유사하다. 쌍떡잎식물에서는 globular stage, heart stage, torpedo stage 및 cotyledonary stage를 거치고 외떡잎식물에서는 globular stage, scutellar stage 및 coleoptilar stage를 거친다(Mordhorst et al., 1997). 또한 구과식물의 경우 globular stage, early cotyledonary stage 및 late cotyledonary stage로 나뉜다(Quiroz-Figueroa et al., 2006).

체세포배 발생에는 두 종류가 있는데, 표피세포(epidermis cell)가 직접적으로 체세포배가 되는지 또는 캘러스 과정을 거친 후 체세포배가 발생하는지에 따라 직접 체세포배 발생(direct somatic embryogenesis)과 간접 체세포배 발생(indirect somatic embryogenesis)으로 구분된다(Radoeva and Weijers, 2014). 간접

체세포배 발생을 하는 종이 대부분이기 때문에 다수의 연구가 이를 중심으로 하여 이루어졌다(Corredoira et al., 2013; Cuenca et al., 1999; Gaj, 2004; Ikeda-Iwai et al., 2002; Montalban et al., 2012). 하지만 그 둘이 동시에 일어날 수 있다는 것이 보고되기도 하였다(Gaj, 2004; Turgut et al., 1998). 또한 발생한 체세포배로부터 새로운 체세포배가 발생하는 2차 체세포배 발생이 관찰되었다(Raemakers et al., 1995).

체세포배 발생이 1957년부터 꾸준히 연구되어 왔지만 그 기작이 아직 명확히 밝혀진 바 없고, 특히 임목에서는 연구가 부족하다(Rupps et al., 2016). 임목에서 처음으로 체세포 배발생 조직(somatic embryogenic tissue)이 관찰된 것은 백단나무(sandalwood, *Santalum album*)에서였다(Rao, 1965). 그 이후에 침엽수종을 중심으로 배발생 세포(embryogenic cell) 유도에 대한 연구가 이루어지다가(Chalupa and Durzan, 1973; Durzan and Steward, 1968), 이후 배발생 세포에서 식물체를 재발생시키는 과정까지 연구되었다(Bapat and Rao, 1979; Chalupa, 1985).

그 후로도 많은 체세포배 발생 연구는 침엽수에서 이루어졌다. 테다소나무(*Pinus taeda*)의 미성숙 배로부터 배발생 조직을 유도하고 체세포배의 cotyledonary stage까지 유도하였다(Becwar 1990). 또한 라디아타소나무(*Pinus radiata*), 일본잎갈나무(*Larix kaempferi*), 독일가문비(*Picea abies*)에서 배발생 캘러스가 유도되었다(Hakman et al., 1985; Kim, 2015; Montalban et al., 2015). 2000년 대에 들어서 활엽수에서도 체세포배 연구가 진행되었는데, 유칼립투스(*Eucalyptus globulus*), 딸기(*Arbutus unedo*), 글루티노사 오리나무(black alders, *Alnus glutinosa*)에서 체세포배를 유도하였다(Corredoira et al., 2015; El-Mahrouk et al., 2010; Prakash and Gurumurthi, 2010).

피나무류에서도 체세포배 연구가 이루어진 바 있다. 1987년에

국내에서 처음으로 피나무 1차 엽조직과 미숙배로부터 체세포배를 유도했다(김만조, 1987; 김만조 등, 1990), 이후 피나무 체세포배로부터 2차 체세포배 발생을 유도한 연구가 있으며(Kim et al., 2006), 피나무의 체세포배가 표피세포에서 유래한 둥근 모양의 털(glandular trichome)로부터 유도된다는 것을 해부학적으로 밝혔다(Kim et al., 2007). 해외 피나무 속 수종인 *Tilia cordata*에서 체세포배가 유도되는 조건을 연구하였으며, 발생한 체세포배의 구조를 밝혔다(Chalupa, 1990; Karkonen, 2000).

제 3 절 체세포배 유전자 연구

식물호르몬은 체세포가 배발생 능력을 가지도록 하는 데 영향을 미친다. 체세포배는 보통 합성 옥신(auxin)인 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)로 유도되는데, 옥신은 일반적으로 산화 스트레스를 유도하여 식물에게 독성을 띤다. 이러한 산화 스트레스는 체세포가 배를 발생시키도록 세포를 재프로그래밍(reprogramming)할 수 있다(Karami et al., 2009). 또한 지베렐린(gibberellin, GA)은 간접적으로 체세포배 발생을 방해하는 것으로 알려져 있다(Guan et al., 2016). 이러한 식물호르몬을 조절하여 체세포배를 발생시키는 역할을 하는 여러 유전자가 연구되었다(Figure 1).

*LEAFY COTYLEDON (LEC)*는 체세포배 발생에 관여하는 대표적인 유전자이다. *LEC*에 속하는 *LEC1*과 *LEC2*는 옥신 생합성 과정을 조절하는 유전자를 촉진시킨다(Curaba et al., 2004; Gaj et al., 2005). 또한 *LEC2*와 *FUS3*는 지베렐린의 생합성 과정을 억제한다(Curaba et al., 2004).

*AGAMOUS-like 15 (AGL15)*는 *LEC2*에 의해 직접적으로 유도된다(Braybrook et al., 2006). *AGL15*는 지베렐린을 비활성화시키는 유전자와 옥신을 유도하는 유전자를 촉진시키는 역할을 한다(Wang et al., 2004).

*BABY BOOM (BBM)*의 과발현으로 애기장대의 잎과 배에서 체세포배 발생을 유도한 연구가 있었다(Boutilier et al., 2002). *WUSCHEL-related homeobox (WOX)*는 *LEC* 유전자들을 촉진시킨다(Zuo et al., 2002).

SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) 유전자는 *AGL15*와 단백질 복합체(complex)를 형성하면서 체세포배 발생에 관여한다(Karlova et al., 2006).

*B3 VP1/ABI3-LIKE (VAL)*와 *PICKLE (PKL)*은 *LEC* 유전자의 발현을 억제시킨다(Dean Rider et al., 2003; Suzuki et al., 2007). 또한 *PICKLE*은 지베렐린 합성과 신호전달 과정에 관여한다(Ogas et al., 1999).

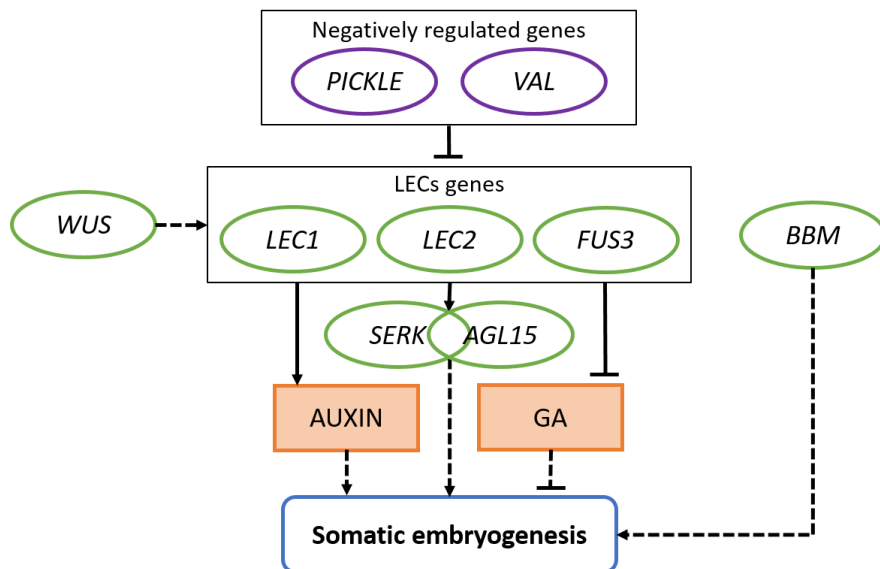


Figure 1. Regulatory interactions of genes controlling somatic embryogenesis

제 3 장 재료 및 방법

제 1 절 시료 채취 및 배양

피나무류 종자는 경기도 화성시 매송면 어천리에 위치한 피나무 채종원에서 채취하였다. 피나무 채종원은 2002년 피나무 1클론, 섬피나무 9클론, 찰피나무 1클론씩 총 0.5ha 면적으로 조성되었다. 피나무, 섬피나무, 찰피나무 각각 한 개씩의 클론으로부터 두 차례(2017년 7월 21일, 8월 2일) 미성숙 종자를 채종하였다.

채취한 종자는 무균대에서 70% 에탄올에 1분, 2% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 용액에 8분 담가 소독하고 증류수로 5회 행구었다. 소독한 종자에서 미성숙 배를 분리한 후 Kim et al. (2006)의 방법을 따라 2,4-D 1.0mg/L가 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 치상하였다. 배지는 겔라이트 0.3%(w/v), 수크로즈 3%(w/v)을 포함하고 pH 5.8로 맞춰 121℃에서 15분 멸균한 후 직경 9mm 크기의 페트리 접시에 25ml씩 분주하여 제작하였다. 미성숙 배를 치상한 배지는 밀봉하여 25±2℃, 습도 40%로 유지되는 무균실에서 암배양하였다.

유도된 체세포배가 식물체로 성장할 수 있는지 확인하기 위하여 체세포배를 분리하여 호르몬이 없는 MS 배지에서 배양하였다. 체세포배로부터 뿌리가 완전히 분화한 이후에는 MS, 한천(plant agar) 0.8%(w/v), 수크로즈 3%(w/v), 항생제 0.5ml/L의 배지에서 계대 배양되었다. 계대배양 배지는 pH 5.8로 맞추었고 121℃에서 15분 멸균한 후 시험관에 8ml씩 분주하였다. 실험현미경(Nickon, SMZ745T)으로 체세포배 발생 과정을 관찰 및 촬영하였다.

제 2 절 유전자 탐색

1. RNA 추출과 cDNA 합성

피나무와 섬피나무의 체세포배를 발생 단계 별로 액체질소에 담가 동결하여 샘플링하였다. 배양 전 분리된 미성숙배, globular stage, heart stage, torpedo stage 및 cotyledonary stage의 체세포배를 샘플링하였고, 비교를 위해 발아시킨 종자를 추가 샘플링하였다. 샘플링은 생물학적 반복을 두기 위하여 여러 개체를 한 튜브에 담는 방법으로 클린벤치에서 무균상태로 진행되었다. 샘플은 Qiagen TissueLyser II를 이용하여 파쇄하였고, Qiagen RNeasy Plant Mini kit를 이용하여 totalRNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 농도는 NanoVue plus spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

cDNA 합성은 Takara reagent cDNA synthesis kit을 사용하였다. 5X prime script buffer $4\mu\text{l}$, Prime script RT enzyme mix1 $1\mu\text{l}$, Oligo dT Primer $1\mu\text{l}$, Random 6mer $1\mu\text{l}$ 에 RNA 1000.0ng을 넣고 RNase free water로 부피를 $20\mu\text{l}$ 로 맞추었다. Takara thermal cycler dice로 37°C 에 15분, 85°C 에 5초 동안 반응시켰다.

2. PCR과 전기영동

유전자 탐색에 사용된 프라이머와 그 출처는 Table 1과 같다. 바이오니어 사의 AccuPower® PCR PreMix & Master Mix에 순방향 프라이머(forward primer) $1\mu\text{l}$, 역방향 프라이머(reverse primer) $1\mu\text{l}$, cDNA $1\mu\text{l}$, 순수 $17\mu\text{l}$ 를 넣었다. PCR은 95°C 에서 2분 동안 열을 가한 후, 94°C 에서 20초 동안 열변성(denaturation), 결합온도(annealing temperature)에서 40초 동안 결합(annealing), 72°C 에서 1분 20초 동안 중합반응(elongation)하는 과정을 34회 반복하였다. 이후

72℃에서 10분 추가 중합반응을 시켰다. 이후 전기영동을 통해 밴드를 확인하였다. 전기영동에 사용되는 겔(gel)은 TAE 1X buffer와 1.2%의 아가로즈, ecodye를 이용하였고 100mV로 30분 내렸다.

3. PCR 산물 정제와 시퀀싱

전기영동 결과, DNA 밴드가 확인되는 피나무 유전자에 대하여 PCR 산물의 정제(purification)와 시퀀싱을 진행하였다. 정제는 PCR 산물을 전기영동한 겔에서 해당 유전자 크기에 맞는 DNA 밴드 위치를 실험용 칼로 분리한 다음 QIAquick Gel Extraction Kit를 이용하여 DNA를 추출하였다.

분리된 DNA 조각은 마크로젠 사에 시퀀싱을 의뢰하였다. PCR에 사용한 프라이머를 이용해 양쪽 서열을 읽었으며, 순방향 시퀀싱 서열과 역방향 시퀀싱 서열을 정렬하여 피나무의 유전자 서열을 밝혔다. 이를 NCBI database를 이용하여 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)하였다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). 그리고 VectorNTI를 이용하여 비교종 네 종(애기장대, 포플러, 코르크참나무, 쿡)과의 서열을 비교하였다. 각각의 서열은 National Center for Biotechnology (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>)로부터 얻었다.

Table 1. Primers for gene detecting

Gene	Primer sequence (5' →3)	Annealing temperature(°C)	Product size(bp)	Reference
<i>PtSERK</i>	Forward: GCATGGCAGTACATAGGAACC Reverse: GCCTTTAACCCAGTCAAGCAAC	61	518	<i>Pinus taeda</i> (Rupps et al., 2016)
<i>PtWOX2</i>	Forward: TGGAGGCCATGTACAGTCAA Reverse: GCCAGGTGGTTGATGAAACT	58	197	
<i>LEC1</i>	Forward: ATGATGAGAGCAGCAGAGATAAGC Reverse: ATATTTGCCCTCTTCCCCACT	60	477	Conserved region (Nic–Can et al., 2013)
<i>BBM</i>	Forward: CAAGTTGCTCAGATGGTGAAGGAG Reverse: TATGAGCATCCAAAGCCATTTCAG	65	780	
<i>WOX4</i>	Forward: GGAGGGACGAGGTGGAATCCA Reverse: TACTAATGGTAGTGGTGGGGTGAC	60	261	
<i>PICKLE</i>	Forward: ATHCGDCCTGARTGGACHACTG Reverse: GKCCCATYTCATCMGCAAGKAT	50	403	Conserved region (Perez et al., 2015)
<i>VAL1</i>	Forward: TTCAGATWTTGGCCCAAYAAYAA Reverse: TTCGCCATTTGGARCAATYATCAC	54	643	

제 3 절 발현 분석

발현 분석을 위해서 발현량을 정량적으로 나타낼 수 있는 실시간 qPCR(real time quantitative PCR)을 수행하였다. 실시간 qPCR에 사용된 프라이머는 Table 2와 같다. 프라이머는 시퀀싱한 피나무 서열에서 Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)를 이용하여 디자인하였다. 항존유전자(housekeeping gene)로서 *ACTIN*을 사용하였고 샘플 당 세 번의 반복을 두어 실험하였다. 시약은 Bio-rad사의 iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix를 사용하였다. 시약 10 μ l, 순방향 프라이머 1 μ l, 역방향 프라이머 1 μ l, cDNA 1 μ l, 순수 7 μ l를 넣어 20 μ l의 전체 부피를 맞추었다. 실시간 qPCR은 CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System으로 95℃에서 3분 열을 가한 후, 95℃에서 10초, 57.3℃에서 30초를 40회 반복하였다. 발현량 분석은 $\Delta\Delta C_t$ 방법(Livak and Schmittgen, 2001)을 사용하였고, R(3.5.0)을 이용하여 일원분산분석(ANOVA) 및 던컨의 다중검정을 실시하였다.

Table 2. Primers for expression analysis(real time qPCR)

Gene	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>pTaSERK</i>	Forward: GCAAGGGGGCTTGCATATT Reverse: CAGCCCAAAGTCTCCAACA	120
<i>TaPICKLE</i>	Forward: AGCCTTCGAGATGCTGTTG Reverse: TGGTAAGGATGCAGTGAGC	101
<i>TaVAL1</i>	Forward: GATCCCAAAAGGAGGCAAG Reverse: GGATCCTCATTGTCCTGT	120
<i>ACTIN</i> *	Forward: GCCCACGAGCTGTGTTC Reverse: TCTGGCCCATTTCCAACCA	110

*(Perez et al., 2015)

제 4 장 결 과

제 1 절 피나무류 체세포배 유도

피나무, 섬피나무 및 찰피나무를 각각 배양한 결과 8주~16주 사이에 체세포배가 발생하였다. 끝이 둥근 것을 globular stage, 끝이 조금 갈라진 것을 heart stage, 배의 중간까지 깊이 갈라진 것을 torpedo stage, 자엽의 형태가 나타나는 것을 cotyledonary stage로 구분하였다. 피나무와 섬피나무에서는 globular stage, heart stage, torpedo stage 및 cotyledonary stage에 이르는 체세포배 발달 전 과정이 관찰되었다. 찰피나무에서는 globular stage의 체세포배가 유도된 것을 관찰하였다(Figure 2a). 직접 체세포배 발생과 간접 체세포배 발생의 두 가지 방법을 통한 체세포배 발생이 일어났으며 체세포배 발달 단계가 진행됨에 따라 체세포배의 크기가 커짐을 확인할 수 있었다. 체세포배의 마지막 단계인 cotyledonary stage의 체세포배를 분리 및 배양했을 때 완전한 개체로 성장하는 것을 확인하였다(Figure 2b).

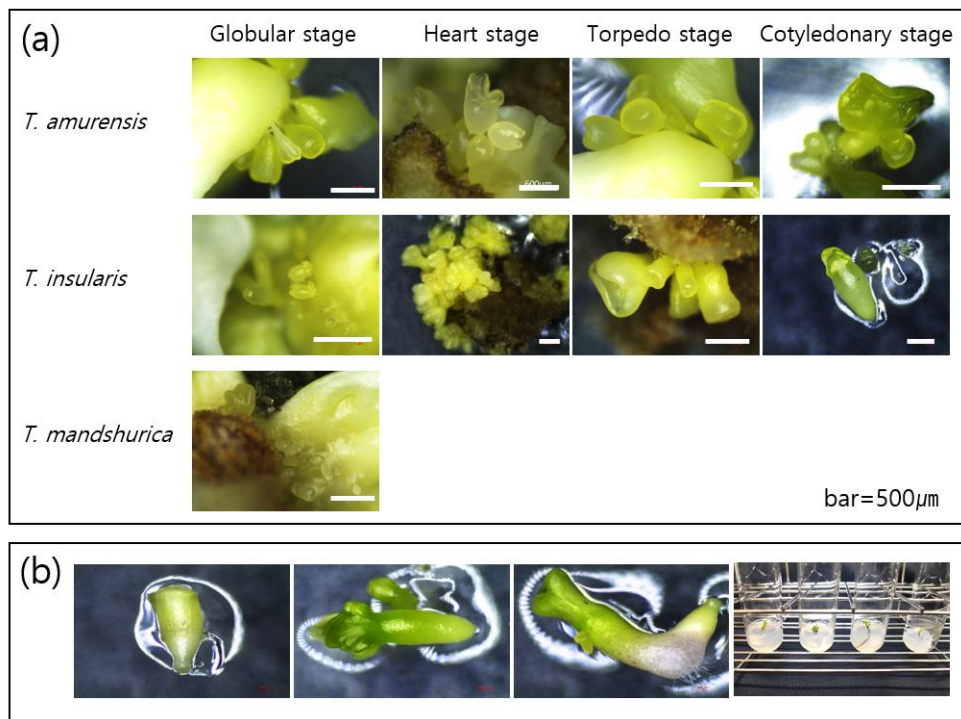


Figure 2. Somatic embryogenesis results. (a) Somatic embryogenesis development stages of *Tilia* species and (b) Somatic embryos that germinated on plant regeneration medium.

제 2 절 피나무 체세포배 유전자

7개 유전자를 피나무에서 증폭시킨 결과 3개의 유전자가 탐색되었다. *PtSERK* 시퀀스로부터 증폭된 *putative-TaSERK* (*pTaSERK*), *PICKLE* 보존서열로부터 증폭된 *putative-TaPICKLE* (*pTaPICKLE*) 그리고 *VAL1* 보존서열로부터 증폭된 *putative-TaVAL1* (*pTaVAL1*)의 서열을 밝혔다.

*SERK*는 *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE*이며, 고류신반복(leucine-rich repeats, LRRs)를 포함하는 receptor-like kinases (RLKs) 그룹에 속하는 유전자이다. 당근의 배아 세포에서 *SERK* 유전자가 발현되는 것이 발견된 이후, 많은 식물에서 *SERK* 유전자 연구가 이루어졌다(Schmidt et al., 1997). *SERK* 유전자는 초기 배 발생 과정에 관련되어 있는 것으로 알려져 있고, *SERK* 유전자의 과발현은 애기장대에서 배아 세포를 형성하는 것으로 밝혀졌다(Hecht et al., 2001).

*PICKLE*은 염색질 재배치 인자(chromatin remodeling factor)인 CHD3 단백질을 코딩하는 유전자로, 세포 분화에 중요한 역할을 한다(Ogas et al., 1999). *PICKLE* 유전자의 전사 조절 기능은 주로 발달을 조절하는 유전자를 억제하는 역할을 한다(Ho et al., 2013). 또한 체세포배 유도에 관여하는 유전자의 발현을 저하시키는 역할을 하고, 체세포배 발생으로 전환되는 단계에서 관여한다(Karami et al., 2009).

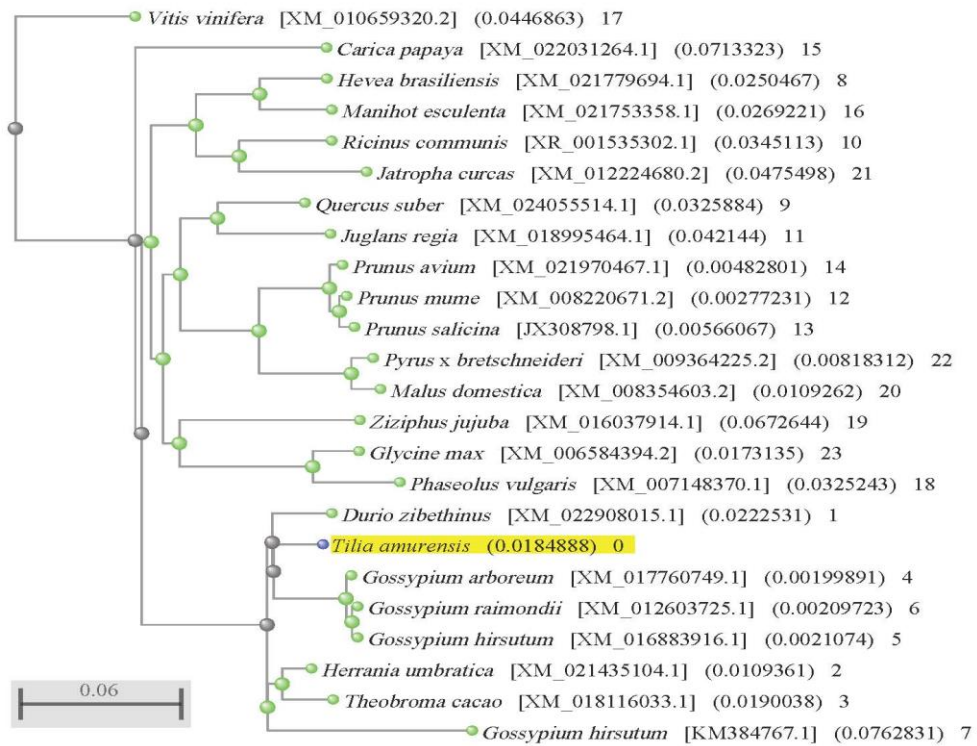
*VAL1*의 정식 명칭은 *VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE1*이며 B3 도메인 전사 억제자(B3 domain-containing transcription repressor)이다. *VAL1*은 LAV 유전자군(family)에 속하며 DNA에 붙어서 역할을 하는 단백질이기 때문에 후생유전학적인 역할을 할 것으로 생각된다(Suzuki et al., 2007).

각각의 서열을 BLAST 한 결과 *pTaSERK*는 22종에서 100건, *pTaPICKLE*은 22종에서 64건, *pTaVAL1*은 3종에서 9건 조사되었다. *pTaSERK*와 가장 유사한 서열이 두리안(*Durio zibethinus*)의 *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1-like (SERK3)*와 헤라니아(*Herrania umbratica*)의 *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1 (SERK3)*이고 similarity score가 776, E-value가 0으로 나왔으며 identity가 96%이었다(Appendix 1). 서열이 가까운 순서로 매겨지는 번호인 align-index의 1번부터 7번까지 모두 피나무가 속한 아욱과(Malvaceae)에 해당하는 종이었다(Figure 3a).

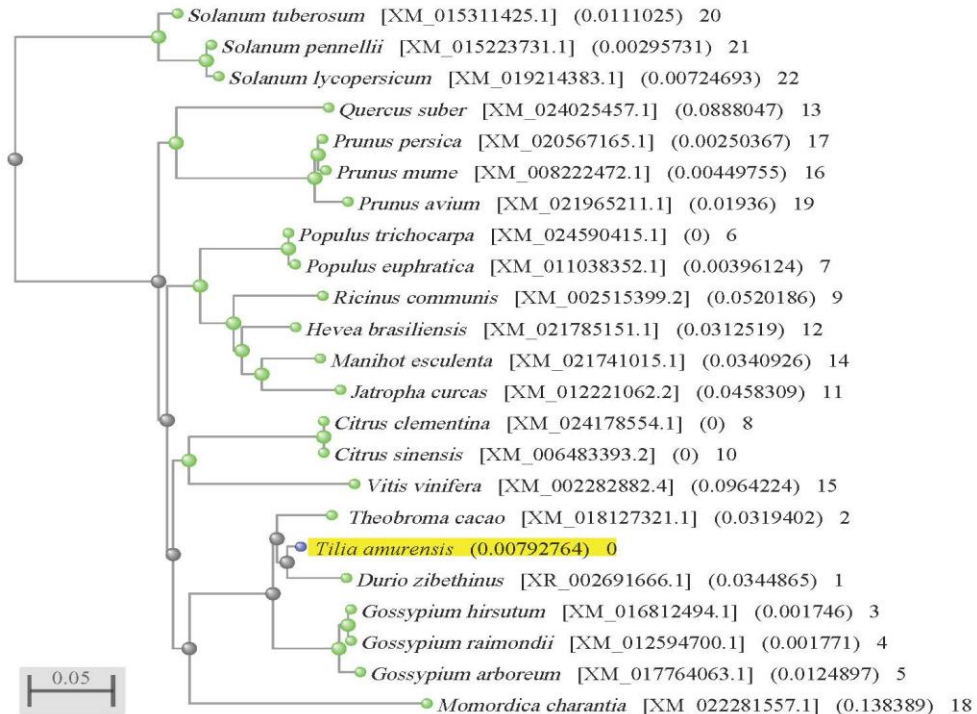
*pTaPICKLE*와 가장 유사한 서열은 두리안의 *CHD3-type chromatin-remodeling factor PICKLE-like*이고 similarity score는 462로 나타났다. E-value는 $2e^{-126}$ 으로 아주 낮았으며 identity는 95%이었다(Appendix 2). Align-index 1번부터 5번까지가 아욱과에 속한 종이었다(Figure 3b).

*pTaVAL1*과 가장 유사한 서열은 카카오(*Theobroma cacao*)의 *B3 domain-containing transcription repressor VAL1* 이었다. Similarity score는 604, E-value는 $6e^{-169}$ 이며 identity는 90%였다(Appendix 3). *pTaVAL1* 서열이 BLAST 된 9건의 결과는 모두 아욱과였다(Figure 3c).

(a)



(b)



(c)

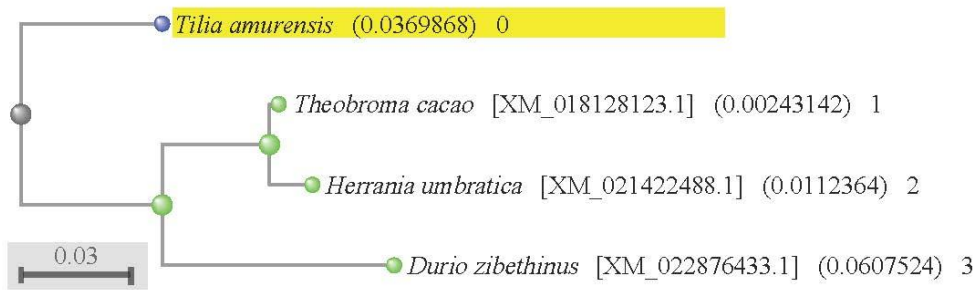


Figure 3. BLAST dendrogram based on alignment similarity scores relative to *Tilia amurensis* sequence. (a) *SERK*, (b) *PICKLE* and (c) *VALI*; species, [sequence accession number], (distance), align-index

pTaSERK, *pTaPICKLE* 및 *pTaVALI*의 염기 서열은 다른 수종의 해당 유전자 서열과 어느 부분이 다른지 정렬(alignment)을 통해 비교할 수 있다. 단백질 서열이 비슷하면 같은 조상을 가지는 상동(homology)이거나 비슷한 기능을 갖는다고 해석된다(Pearson, 2013). 또한 단백질 서열에서 기능을 하는 도메인을 찾아 유전자의 역할이 무엇인지 알아낼 수 있다.

유전자 서열을 비교하기 위해 선정한 종은 애기장대(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), 포플러(*Populus trichocarpa* Torr. & A.Gray ex. Hook.), 코르크참나무(*Quercus suber* L.) 및 콩(*Glycine max* (L.) Merr.)이다. 애기장대는 모델 식물로서 5개 염색체의 119Mb에 달하는 유전체가 모두 분석되어 있어 다수의 연구 논문에서 비교 종으로 사용된다. 또한 애기장대에서 체세포배 발생 유전자의 기작이 비교적 많이 밝혀져 있어 이를 통한 피나무 체세포배 발생 유전자의 역할을 추정하는 것이 가능하다. 포플러는 생장이 빠르고 번식이 편리하여 목본 식물의 모델 수종으로 사용된다. 포플러 또한 19개 염색체 400Mb에 대하여 유전체 분석이 완료되어 있다. 코르크참나무는 대표적 임목이며,

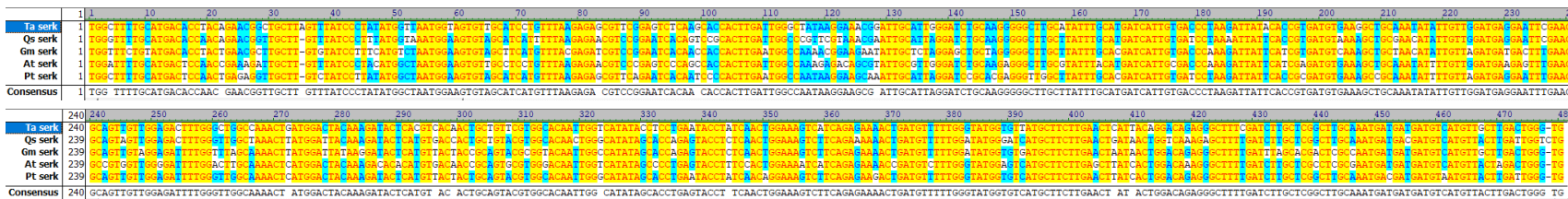
본 논문에서 사용한 것과 같은 프라이머로 *QsPICKLE*과 *QsVAL1*이 증폭되었기 때문에 서열의 유사도가 높을 것으로 예상되어 비교 수준으로 선정하였다. 콩은 피나무와 같이 직접 체세포배 발생을 하는 종으로 체세포가 유도되는 과정이 유사할 것이라 판단되어 유전자를 비교하였다.

시퀀스는 다중 서열 정렬(multiple sequence alignment)과 쌍별 정렬(pairwise alignment)로 나누어 비교하였다. 두 개 이상의 서열을 한 번에 비교하는 다중 서열 정렬은 쌍별 정렬에 비해 구조적, 기능적, 계통적 정보를 많이 포함한다. 반면에 각 비교 수준과 비교하는 쌍별 정렬은 높은 일치도를 보이며 더욱 자세한 정보를 얻을 수 있다(Edgar, 2004).

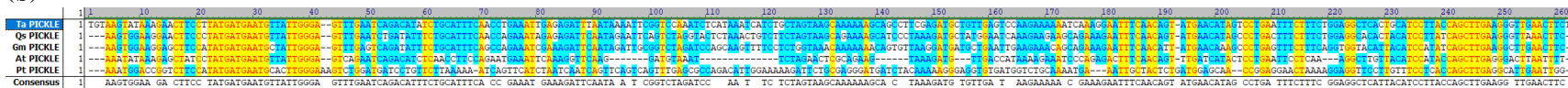
비교수종 네 종과 피나무에 있어 *SERK* 유전자의 consensus position은 97.1%, identity position은 70.8%였다. 또한 *PICKLE* 유전자의 consensus position은 87.6%, identity position은 31.8%였다. *VAL1* 유전자의 consensus position은 68.8%, identity position은 28.5%였으며 그 비교 서열 결과는 Figure 4와 같다.

증폭된 cDNA 서열이 번역된 단백질 서열과 유사한 정도를 보는 것도 중요하다. 여러 종류의 코돈이 같은 단백질을 결정하기 때문에 더욱 높은 일치율을 기대할 수 있다(Watson et al., 1965). 유전자 비교수종 4종과 피나무에 있어 *SERK* 단백질의 consensus position은 100.0%, identity position은 88.1%였으며 *PICKLE* 단백질의 경우 consensus position은 89.4%, identity position은 22.4%였다. *VAL1* 단백질은 58.8%의 consensus position, 20.8%의 identity position을 갖는 유사도를 보였다(Figure 5).

(a)



(b)



(c)

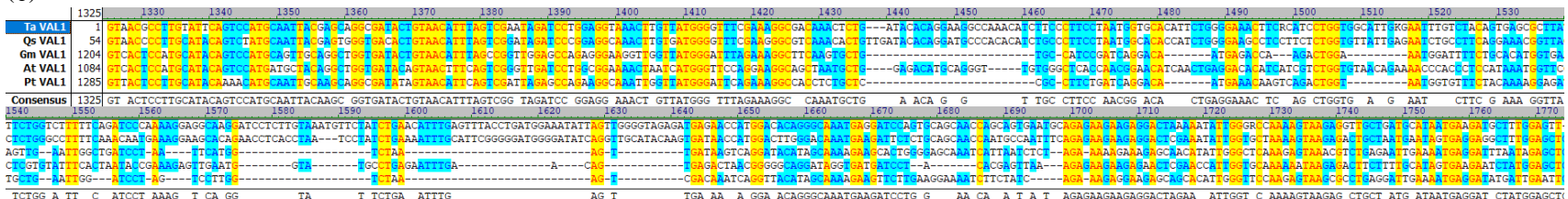


Figure 4. Multiple gene sequence alignment (a) *SERK*, (b) *PICKLE* 및 (c) *VALI*; Yellow boxes mean identical sequences, blue boxes mean conservative sequences, black characters mean non-similar sequences, green boxes mean blocks of similar sequences and green characters mean weakly similar sequences; *Ta*, *Tilia amurensis*; *Qs*, *Quercus suber*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Pt*, *Populus trichocarpa*

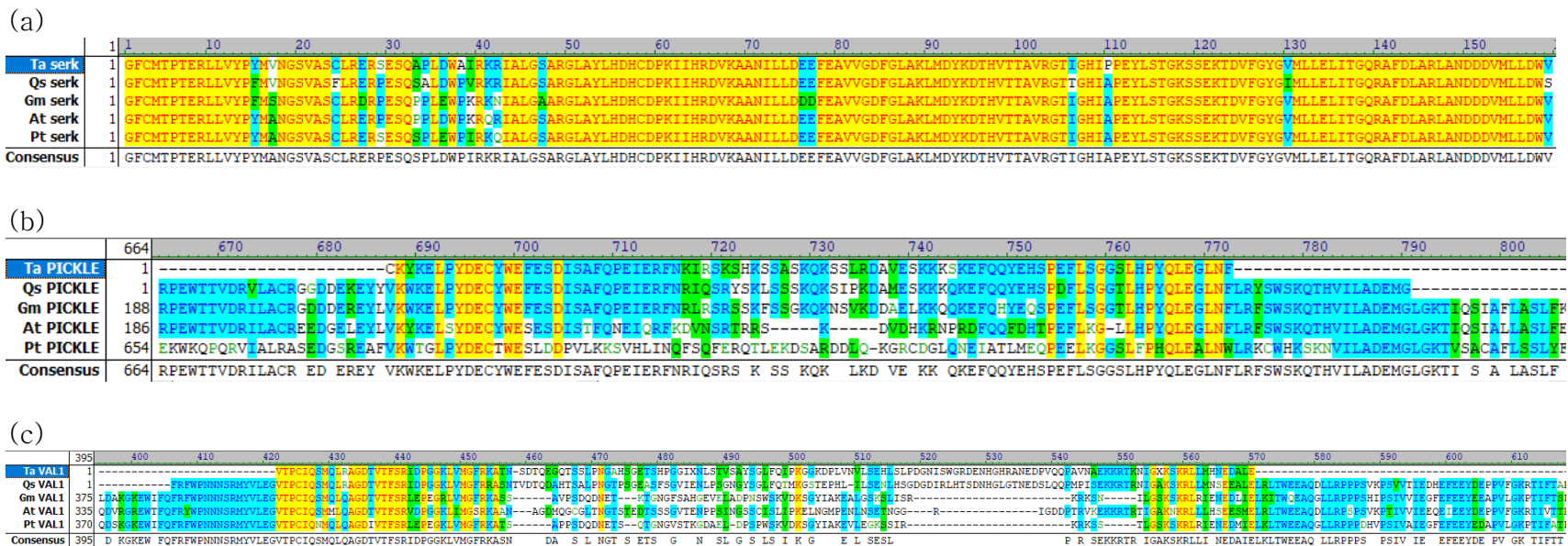


Figure 5. Multiple protein sequence alignment (a) SERK, (b) PICKLE and (c) VAL1; Yellow boxes mean identical sequences, blue boxes mean conservative sequences, black characters mean non-similar sequences, green boxes mean blocks of similar sequences and green characters mean weakly similar sequences; Ta, *Tilia amurensis*; Qs, *Quercus suber*; At, *Arabidopsis thaliana*; Pt, *Populus trichocarpa*

쌍별 정렬(pairwise alignment)의 결과, 유전자마다 단백질 시퀀스가 유사한 종이 다르게 나타났다. SERK는 포플러와 가장 유사하였고, PICKLE과 VAL1은 코르크참나무와 가장 유사한 동시에 포플러와 가장 낮은 일치도를 보였다.

Table 3. Pairwise alignment

Reference	SERK		PICKLE		VAL1	
species	Consensus position(%)	Identity position(%)	Consensus position(%)	Identity position(%)	Consensus position(%)	Identity position(%)
<i>Q. suber</i>	95.6	93.1	91.8	82.4	73.8	63.8
<i>G. max</i>	95.6	91.8	87.1	77.6	45.3	31.8
<i>A. thaliana</i>	95.6	95.6	68.2	55.3	55.4	43.9
<i>P. trichocarpa</i>	97.5	96.2	40.9	34.1	43.2	35.1

제 3 절 유전자 발현 분석

유전자의 발현은 대조군으로 실험에 사용한 배양 전 미성숙배를 기준으로 하여 몇 배로 발현하는지를 나타내었다. *pTaSERK* 유전자의 발현은 피나무와 섬피나무에서 공통적으로 heart stage에서 가장 높았다. Torpedo stage에서는 두 종 모두에서 발현량이 대조군 수준으로 감소하는 것을 확인하였다. 피나무는 체세포배 발생 초기 단계에서 발현이 점차 증가하다가 감소하고 다시 증가하는 양상을 보였으나 섬피나무는 heart stage에서 급격히 증가하였다(Figure 6a and b).

피나무에서 *pTaPICKLE* 유전자의 발현은 *pTaSERK* 유전자와 마찬가지로 heart stage에서 가장 높은 발현량을 보였다. 또한 발아 종자와 torpedo stage에서 낮은 발현을 보였다. *pTaSERK* 유전자와 마찬가지로 체세포배 발생 초기 단계에서 heart stage까지 발현이 증가하고 torpedo stage에서 감소, cotyledonary stage에서 증가하는 양상이 나타났다. 섬피나무에서는 globular stage와 heart stage에서 발현이 낮았다. 두 종 모두에서 발아 종자의 발현이 대조군보다 낮았다(Figure 6c and d).

pTaVAL1 유전자는 피나무에서 heart stage와 cotyledonary stage에서 발현이 높았다. 또한 다른 두 유전자와 마찬가지로 torpedo stage에서 발현이 낮았다. 하지만 globular stage에서 낮은 발현을 보인 것은 두 유전자와 다른 점이다. 섬피나무에서는 모든 발달 단계와 발아 종자에서 대조군 보다 낮은 발현을 보였다(Figure 6e and f).

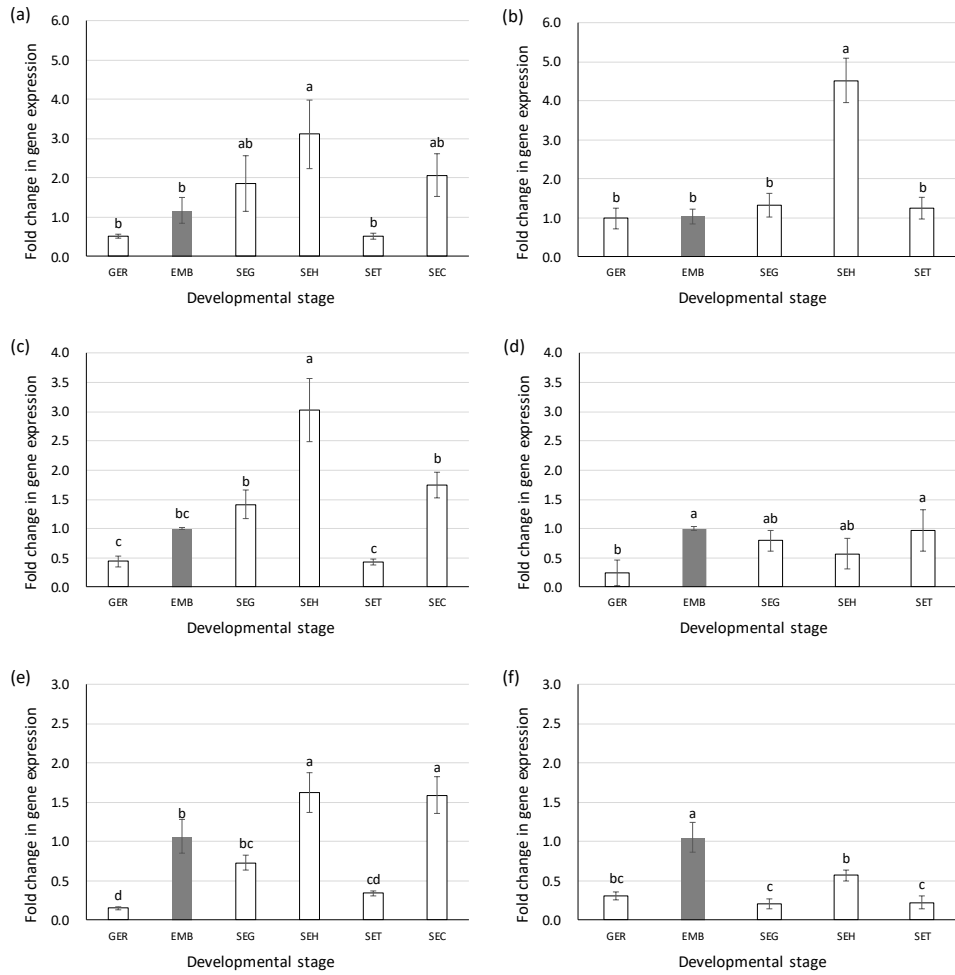


Figure 6. Relative gene expression of *pTaSERK*, *pTaPICKLE* and *pTaVAL1* during the somatic embryogenesis of *Tilia amurensis* and *Tilia insularis*, assessed by real time qPCR. Expression is relative to *ACTIN* gene and normalized for EMB (in gray). (a) *SERK* expression in *T. amurensis*, (b) *SERK* expression in *T. insularis*, (c) *PICKLE* expression in *T. amurensis*, (d) *PICKLE* expression in *T. insularis*, (e) *VAL1* expression in *T. amuresnsis* and (f) *VAL1* expression in *T. insularis*. GER, germinated seed; EMB, immature embryo; SEG, globular stage; SEH, heart stage; SET, torpedo stage; SEC, cotyledonary stage (p ≤ 0.05, Duncan test).

제 5 장 고 찰

제 1 절 피나무 체세포배 유전자

BLAST 결과는 score와 E-value로 나타난다. BLAST sequence similarity score란 두 서열의 시퀀스를 비교하여 점수화한 것이다. 일치하거나 비슷한 염기의 자리에서는 양의 점수를, 불일치하거나 비어있는 자리에서는 음의 점수를 부여하여 전체적으로 더한 값이다. Score가 높을수록 서열이 유사하다는 의미이다. NCBI BLAST에서는 로그 스케일로 보정된 bit-score를 사용한다. Bit-score는 시퀀스 길이에 독립적이기 때문에 여러 유전자 사이에 비교 또한 가능하다(Karlin and Altschul, 1990).

$$S' = \frac{\lambda S - \ln(K)}{\ln(2)}$$

S' is the bit-score, S is the raw score, λ and K depend on the substitution matrix and on the gap penalties

E-value란 임의의 서열을 가지는 시퀀스의 score가 대상 시퀀스의 score(S) 보다 크거나 같을 확률을 의미하는 P-value를 보정한 값이다. E-value가 낮을수록 score가 유의하다는 것을 뜻한다.

$$E = \frac{nm}{2^{S'}}$$

E is the E-value, S' is the bit-score, n is the length of the query sequence and m is the length of the database.

일반적으로 bit-score가 50 이상, E-value가 $1e^{-50}$ 이하이면 두 서열이 상동 관계에 있을 가능성이 매우 높은 것으로 본다. 또한 E-value가 0.01 이하 $1e^{-50}$ 이상이면 두 서열이 상동일 가능성이 고려될 수 있다(Pearson, 2013).

문헌에서 참고한 *SERK*, *PICKLE* 및 *VAL1* 유전자 서열의 프라이머를 이용해 피나무의 체세포배 cDNA를 증폭시켰을 때 얻은 DNA 단편 서열을 BLAST 한 결과, 모든 건(hit)에서 bit-score가 50 이상으로 높게 나타났다(Appendix 1, 2, 3). 또한 E-value는 *pTaSERK* 유전자 100건 전체, *pTaPICKLE* 유전자 48건, *pTaVAL1* 유전자 9건 전체에서 $1e^{-50}$ 보다 낮은 결과가 나타났다. *pTaPICKLE* 유전자의 나머지 16건은 0.01보다 낮은 수치를 보였다. 이를 통해 피나무에서 증폭된 서열이 각각의 유전자와 상동인 것으로 판단하였다.

피나무의 세 유전자 *pTaSERK*, *pTaPICKLE* 및 *pTaVAL1*의 BLAST 결과에는 31개 종(species)의 유전자가 포함되어 있다. 피나무와의 분류학적 거리가 가까운 종의 score가 높았다(Table 4). 피나무와 같은 아욱과(Malvaceae)에 속하는 6 종에서 score가 가장 높고 그 다음으로 같은 아군(subclade)에 속하는 3 종에서 높은 것을 확인할 수 있다. 또한 군(clade)이 다른 세 종에서 가장 낮은 score를 보였다.

Table 4. Taxonomy information of BLAST species

Clade	Subclade	Order	Family	Genus	species	Score			
						<i>SERK</i>	<i>PICKLE</i>	<i>VALI</i>	
Rosids	Malvids	Malvales	Malvaceae	<i>Tilia</i>	<i>T. amurensis</i>	—	—	—	
				<i>Durio</i>	<i>D. zibethinus</i>	776	462	544	
				<i>Theobroma</i>	<i>T. cacao</i>	771	427	604	
				<i>Herrania</i>	<i>H. umbratica</i>	776		590	
				<i>Gossypium</i>	<i>G. hirsutum</i>	754	409		
					<i>G. raimondii</i>	754	399		
					<i>G. arboreum</i>	760	398		
			Brassicales	Caricaceae	<i>Carica</i>	<i>C. papaya</i>	527		
		Sapindales	Rutaceae	<i>Citrus</i>	<i>C. clementina</i>		279		
					<i>C. sinensis</i>		279		
	Fabids	Malpighiales	Salicaceae	<i>Populus</i>	<i>P. trichocarpa</i>		291		
					<i>P. euphratica</i>		285		
			Euphorbiaceae	<i>Ricinus</i>	<i>R. communis</i>	551	279		
				<i>Jatropha</i>	<i>J. curcas</i>	512	274		
				<i>Hevea</i>	<i>H. brasiliensis</i>	568	268		
				<i>Manihot</i>	<i>M. esculenta</i>	523	254		
			Fagales	Fagaceae	<i>Quercus</i>	<i>Q. suber</i>	551	257	
				Juglandaceae	<i>Juglans</i>	<i>J. regia</i>	540		

Clade	Subclade	Order	Family	Genus	species	Score		
						<i>SERK</i>	<i>PICKLE</i>	<i>VAL1</i>
Rosid	Fabids	Rosales	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>P. mume</i>	538	224	
					<i>P. salicina</i>	538		
					<i>P. persica</i>		213	
					<i>P. avium</i>	532	191	
				<i>Malus</i>	<i>M. domestica</i>	516		
				<i>Pyrus</i>	<i>P. x bretschneider</i>	505		
			Rhamnaceae	<i>Ziziphus</i>	<i>Z. jujuba</i>	518		
		Cucurbitales	Cucurbitaceae	<i>Momordica</i>	<i>M. charantia</i>		202	
		Fabales	Fabaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>P. vulgaris</i>	521		
				<i>Glycine</i>	<i>G. max</i>	505		
		Vitales	Vitaceae	<i>Vitis</i>	<i>V. vinifera</i>	521	254	
Asterids	Lamiids	Solanales	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>S. tuberosum</i>		152	
					<i>S. pennellii</i>		126	
					<i>S. lycopersicum</i>		121	

*Angiosperm Phylogeny Group III (2009)

BLAST 결과와 비교종과의 서열 비교에서 *pTaSERK*는 높은 일치도를 보였는데, 시퀀싱된 서열이 SERK 단백질의 세린/트레오닌 인산화효소(serine/threonine kinase) 코딩 시퀀스에 포함되는 부분이었기 때문이다. 촉매 작용을 하는 도메인이 존재하는 것으로 보아 기존에 연구된 SERK와 비슷한 촉매 기능을 할 것으로 추정된다(Figure 7a).

pTaPICKLE 유전자는 *pTaSERK* 보다는 낮지만 80% 이상의 높은 일치도를 보였다. 시퀀싱된 PICKLE 단백질 서열의 앞부분은 크로모 영역 도메인(chromatin organization modifier domain)의 일부였고, 뒷부분 9개 아미노산은 SNF2 유전자군 아미노말단 도메인(SNF2 family N-terminal domain)의 일부였다. 두 가지의 도메인이 존재하는 것으로 보아 기존의 PICKLE 단백질과 유사한 기능을 할 것으로 추정할 수 있지만, 중간 서열은 변이가 많았고 특히 애기장대에서 정렬의 갭(gap)을 보이는 부분이 있었다. 이 부분이 히스톤 결합 자리(histone binding site)를 다수 포함하고 있지만 특정한 기능은 하지 않기 때문에 이 부분에서 종 간에 변이가 생겼을 가능성이 있다(Figure 7b).

*pTaVAL1*은 비교종과의 정렬에서 약 69%로 일치도가 낮은 결과를 보였는데, 앞의 35개의 아미노산만이 기능을 하는 부분이었기 때문이다. 이 부분은 식물 특이적 B3 DNA 결합 도메인(Plant-specific-B3-DNA binding domain)의 일부였다. 그 외의 서열들은 변이가 컸는데, 코르크 참나무를 제외한 세 종에서 갭을 보이는 부분이 많았다. *pTaPICKLE* 유전자와 마찬가지로 기능을 하지 않는 부위에서 종 간에 변이가 생겼을 것으로 추정된다(Figure 7c).

피나무 유전자 *pTaSERK*, *pTaPICKLE* 및 *pTaVAL1*을 시퀀싱 한 유전자 서열을 이용해 유전자 발현 분석 및 단백질 기능 분석을 하는 데 사용될 수 있으며 다른 종과의 유연관계를 밝히는 데도 이용될 수 있을

것이다. 또한 피나무 유전자 *pTaPICKLE*과 *pTaVAL1*은 다른 종 서열에는 포함되지 않는 서열을 가지고 있었기 때문에 피나무만이 가지고 있는 변이에 대해서 연구할 수 있으며 이를 마커로 활용할 수 있다. 피나무에서의 유전체 시퀀스가 처음으로 밝혀졌기 때문에 RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) 등의 방법을 이용하여 코딩시퀀스(CDS, coding sequence) 전체를 시퀀싱하면 후보 유전자로서 데이터베이스에 등록이 가능할 것이다.

(a)

	1	Catalytic domain of the Serine/Threonine kinase
Ta serk	1	GFCMTPTERLLVYPYPMVNGSVASCLRERESQAPLDWAIKRIALGSARGLAYLHDHCDPKIIHRDVKAANILLDEEFAVVGDFGLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIIGHIPPEYLSTGKSSEKTDVFGYGVMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWV
Qs serk	1	GFCMTPTERLLVYPYPMVNGSVASFLRERESQSALDWPVKRIALGSARGLAYLHDHCDPKIIHRDVKAANILLDEEFAVVGDFGLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIIGHIAPEYLSTGKSSEKTDVFGYGVMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWS
Gm serk	1	GFCMTPTERLLVYPYPMVNGSVASCLRDRPESQPLEWPKRKNIALGAARGLAYLHDHCDPKIIHRDVKAANILLDDFEAVVGDFGLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIIGHIAPEYLSTGKSSEKTDVFGYGVMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWV
Pt serk	1	GFCMTPTERLLVYPYPMVNGSVASCLRERESQSPLDWPIRKRIALGSARGLAYLHDHCDPKIIHRDVKAANILLDEEFAVVGDFGLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIIGHIAPEYLSTGKSSEKTDVFGYGVMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWV
At serk	1	GFCMTPTERLLVYPYPMVNGSVASCLRERESQPLEWPKRKRIALGSARGLAYLHDHCDPKIIHRDVKAANILLDEEFAVVGDFGLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIIGHIAPEYLSTGKSSEKTDVFGYGVMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWV
Consensus	1	GFCMTPTERLLVYPYPMVNGSVASCLRERESQSPLDWPIRKRIALGSARGLAYLHDHCDPKIIHRDVKAANILLDEEFAVVGDFGLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIIGHIAPEYLSTGKSSEKTDVFGYGVMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWV

(b)

	1	COMD	40	50	60	70	SNF
PKL Ta	1	KWKELPYDECYWEFESDISAFQPEIERFNKIRSKSHKSSASKQKSSLRDAVESKKKSKKEFQQYEHSPDFLSGGSLHPYQLEGLNF					
PKL Qs	1	KWKELPYDECYWEFESDISAFQPEIERFNRIQSRYSKLSSSKQKSIKPDAMESKKKQKEFQQYEHSPDFLSGGTLHPYQLEGLNF					
PKL Gm	1	KWKELPYDECYWEFESDISAFQPEIERFNRLRSRSKSFSSGKQKNSVKDDAELKKQKEFQHYEQSPDFLSGGTLHPYQLEGLNF					
PKL At	1	KWKELPYDECYWEFESDISAFQPEIERFNRLRSRSKSFSSGKQKNSVKDDAELKKQKEFQHYEQSPDFLSGGTLHPYQLEGLNF					
PKL Pt	1	KWKELPYDECYWEFESDISAFQPEIERFNRLRSRSKSFSSGKQKNSVKDDAELKKQKEFQHYEQSPDFLSGGTLHPYQLEGLNF					
Consensus	1	KWKELPYDECYWEFESDISAFQPEIERFNRI SRS KSSS KQK KD VE KK QKEFQQYEHSPDFLSGGSLHPYQLEGLNF					

(c)

	1	PBD	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
val Ta	1	VTPCIQSMQLRAGDVTFTFSRIDPGGKLVMGFRKATN-SDTQEGQTSSLPNGAHS-ETSHFGGIXNLSTVSAYSGLFQIPKG-KDPLNVLSLSEHLSLDPGNISWGRDENHGHHRANEDFVQQPAVNAEKKRTKNIQXKSKRLLMHNEDEALE											
VAL Qs	1	VTPCIQSMQLRAGDVTFTFSRIDPGGKLVMGFRASNTVTDQAHTSALPNGTFS-EASFSGVNIENLPSGNGYSGLFQTMKGSTEPHL-ILSENLSHSGD-DIRLHTSDNHGLGTNEDSLQQPMPISEKKRTKNIQXKSKRLLMNSEEAL											
VAL Gm	1	VTPCIQSMQLRAGDVTFTFSRLPEGRVLMGFRKASS--AV-----PSDQDNET-KTGMGFSAGGEVELADPNWSKVDKSGYIA-EALGSKSLISR-----K-----RKSNIIGSKSKRLRIENEDLIE											
VAL At	1	VTPCIQSMQLRAGDVTFTFSRVDPGGKLVMSRKAAN--AG-DMQGGCLTNGTSTEDTSSSGVTENPPSINGSSCISLIP-----KELNGMPENLNS-ETN--G---GRIG--DDPTRYKE-----KRTRTIGAKNKRLLHSEESME											
VAL Pt	1	VTPCIQSMQLRAGDVTFTFSRLPEGRKLVMGFRKATS--AP-----PSDQDNETSGTGMVSTKGAEL-DPSFWSKVDKSGYIA-EVLEGGKSSIR-----K-----RKSNIIGSKSKRLRIENEDLIE											
Consensus	1	VTPCIQSMQLRAGDVTFTFSRIDPGGKLVMGFRKASN A D L NG PSDE S SG T N S G S L SK L IAE L DS I G V KKRTR IGAKSKRLLI NEDAIE											

Figure 7. Protein functional domain (a) SERK, (b) PICKLE and (c) VAL1; COMD, chromatin organization modifier domain; SNF, SNF2 family N-terminal domain; PBD, Plant-specific B3-DNA binding domain

제 2 절 유전자 발현 분석

SERK 유전자는 애기장대에서만 다섯 종류가 발견되었고 많은 식물에서 그 발현이 연구되었다. 유럽잎갈나무(*Larix decidua* Mill.)에서 *LdSERK* 유전자는 모든 체세포배 발달 단계에서 발현하였지만 후기 단계에서 발현이 증가하는 양상을 보였고 치수에서는 거의 발현하지 않았다(Rupps et al., 2016). 침엽수의 체세포배 발달 단계가 피나무의 발달단계와 다르기 때문에 대응시켜서 해석하기 어려움이 있지만, 세포가 체세포배 발생을 결정하는 단계에서 체세포배가 분화하는 단계로 바뀌면서 그 발현이 늘어나는 것을 보았을 때, 피나무와 섬피나무 체세포배 발생에서 분화가 시작되는 단계인 heart stage에서 증가하는 양상을 보이는 것은 유럽잎갈나무에서의 연구와 일치하는 결과라고 해석할 수 있다.

포도(*Vitis vinifera* L.)에서도 *SERK* 유전자의 발현 연구가 있었다. 이 연구에서는 세 개의 *SERK* 유전자(*VvSERK1*, *VvSERK2* 및 *VvSERK3*)의 발현을 나누어서 보았는데, *VvSERK1*과 *VvSERK2*는 배양 전 배 단계에서 가장 높게 발현하였고 호르몬에 의해 체세포배가 유도되면서 발현이 줄어들었다. 하지만 *VvSERK3* 유전자는 단계 별로 일정한 발현을 보였다(Maillot et al., 2009). *pTaSERK*의 BLAST 결과를 보았을 때 *SERK* 유전자군 중에서도 *SERK3*와 가장 유사하다는 것을 알 수 있다. 따라서 *pTaSERK*의 발현은 *VvSERK3*의 발현과 비교하는 것이 바람직하다. 체세포배 발생 단계와 관계없이 일정한 발현을 보인 포도에서의 연구결과와 피나무에서의 단계 별로 증감이 있었던 *SERK* 유전자 발현 양상은 크게 다른 것을 알 수 있다.

코코넛(*Cocos nucifera* L.)의 체세포배 형성 과정에서 *SERK*의 발현을 보았을 때 배양 15일 차에만 크게 발현하였고 그 이후에 다시

감소하였다(Perez-Nunez et al., 2009). 발달 단계가 아닌 배양 일수를 기준으로 샘플링하였기 때문에 본 연구와 직접적으로 비교하기 어렵지만, 섬피나무와 피나무에서 heart stage에 크게 발현하고 다시 감소하는 양상과 유사하다고 할 수 있다.

콩벚나무 (*Prunus incisa* Thunb.)와 파인애플 (*Ananas comosus* (L) Merr.), 콩에서도 배발생 캘러스에서의 *SERK3* 발현을 보았는데 발현량이 증감을 반복하며 변동하는 양상을 보였다(Ma et al., 2014; Mahmoud et al., 2013; Yang et al., 2011). 연구논문에서는 이를 2차 체세포배 발생을 하면서 생기는 현상이라고 설명하였는데, 이러한 발현 양상이 피나무와 유사하여, 피나무도 2차 체세포배 형성 또는 캘러스 발생이 동반되면서 발현의 변화가 생겼을 가능성이 있다.

종합하면, *SERK* 유전자는 종마다 크게 다른 발현 양상을 보이기 때문에 어느 발달 단계에서 어떤 역할을 하는지를 단정지어 말하기 어렵다. 이 중에서도 피나무의 발현은 유럽잎갈나무, 콩벚나무, 파인애플, 콩에서의 발현과 유사하였고 섬피나무는 유럽잎갈나무와 코코넛에서의 발현과 유사하였다. 따라서 피나무와 섬피나무 *SERK* 유전자의 역할은 이들 종에서의 *SERK* 유전자의 기능과 유사하다고 예측할 수 있다. 이로부터 유추한 *pTaSERK* 유전자는 초기 체세포배 발생에서 체세포배의 분화를 유도하는 역할을 하는 것으로 보인다.

피나무에서 *PICKLE* 유전자와 *VAL1* 유전자의 발현이 유사하게 나타났다. 그 이유는 두 유전자가 전사 요인으로서 유사한 역할을 하기 때문이라고 추정할 수 있다. *PICKLE*과 *VAL1*은 체세포배 발생 과정에서 그 발현이 연구된 것이 드물다. 코르크 참나무에서 연구된 것을 보면, 두 유전자 모두 globular stage의 체세포배가 발생하는 단계에서 발현이 높았고 이후 cotyledonary stage에서 발현량이 낮아졌다(Perez et al., 2015). Heart stage와 cotyledonary stage에서

두 유전자의 발현이 높았던 피나무나 모든 단계에서 대조군보다 발현이 낮거나 같았던 섬피나무와는 다른 양상이다.

피나무와 섬피나무의 발현을 비교했을 때, 같은 유전자의 발현이 두 종에서 다르게 나타나는 것을 보아서 유전자의 역할이 피나무와 섬피나무에서 다를 수 있다. 특히 *PICKLE*와 *VAL1*은 피나무에서와 달리 섬피나무에서 발현이 낮았기 때문에 유전자의 역할이 다를 가능성이 크다고 판단된다. 따라서 섬피나무의 해당 유전자 전체 서열을 시퀀싱하여 피나무와 비교 연구할 필요가 있다.

연구되었던 유전자들은 체세포배 발생 이외에도 많은 역할을 가지고 있다. *SERK3*는 식물 면역에 관여하고 식물호르몬 브라시노스테로이드(brassinosteroid)의 신호전달에도 관여한다. *SERK4*는 세포사(cell death)를 조절하는 데 관여하며 *SERK1*, *SERK2*는 소포자형성(microsporogenesis)에서 중요한 역할을 한다(Albrecht et al., 2008). 또한 *PICKLE*은 세포 분화에 중요한 역할을 하고 또한 식물분열조직(meristem)을 유지시키는 역할을 한다(Aichinger et al., 2011). *VAL1* 역시 정단분열조직(apical meristem)이 발달하고 유지하는 데 역할을 한다(Suzuki and McCarty, 2008). 따라서 체세포배 발달 단계에서 연구 대상 유전자들의 다른 기능으로 인해 다양한 발현을 보일 수 있다.

피나무는 직접 체세포배 발생을 주로 한다. 직접 체세포배 발생은 잠재적으로 존재하던 전-배발생 조직(proembryogenic competent cell)이 적당한 환경이 주어졌을 때 반응하며 이루어진다. 이 경우 유전자에 의한 리프로그래밍은 최소한으로 줄어들 수 있다(Karami et al., 2009). 이러한 사실을 고려해봤을 때, *PICKLE*과 *VAL1* 유전자의 발현이 체세포배 발달 단계에 따라 큰 차이를 보이지 않은 섬피나무의 경우 유전적 요인보다 환경적 요인에 더욱 큰 영향을 받았을 가능성이

있다.

본 연구에서는 피나무 체세포배 발생 조절 유전자의 서열과 발현을 연구하였다. 피나무의 체세포배 발생 조절 유전자 연구는 향후 피나무의 대량 증식 혹은 클론 보존에 큰 도움이 될 것으로 예상된다. 또한 체세포배 발생 조절 유전자들이 일반적인 배 발생에도 관여하기 때문에 이들 유전자를 주목하여 연구하면 쓰임이 많을 것이다(Li et al., 2017). 본 연구에서 밝힌 세 유전자 *pTaSERK*, *pTaPICKLE* 및 *pTaVAL1*이 이전에 연구된 유전자와 상동성이 있다고 하여 같은 역할을 한다고 단정지을 수 없다. 후속 연구로서 과발현(overexpression)이나 유전자삭제(knock-out) 등의 실험을 통해서 피나무 체세포배 발생 조절 유전자가 실제 형질에 미치는 영향을 명확히 밝히는 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 *SERK* 유전자와 관련이 있는 *AGL15* 유전자, 그리고 *PICKLE*과 *VAL1* 유전자가 억제한다고 알려진 *LEC1* 유전자에 대해서도 연구한다면 피나무의 체세포배 발생 기작을 더욱 심도 있게 이해할 수 있을 것이다.

인 용 문 헌

- 김기중, 정영호 (1986). 피나무屬 植物의 分布에 관한 研究. *Jornal of Apiculture* 1, 24-45.
- 김만조 (1987). 第1次 葉組織과 未熟胚를 利用한 피나무의 器內 胚發生에 關한 研究, 서울대학교 대학원 석사학위논문, 서울.
- 김만조, 현정오, 김성재, 김인식 (1990). 피나무 幼苗의 1次葉을 利用한 器內 胚發生. 한국양봉학회지 5, 35-42.
- 김문섭, 김세현, 송정호, 김혜수 (2013). 섬피나무의 꿀벌 방화 및 화밀 분비 특성과 기상과의 관계. 한국양봉학회지 28, 331-337.
- 김문섭, 송정호, 김혜수, 김세현 (2014). 피나무속 3수종의 화밀 분비 특성. 한국양봉학회 학술대회 자료집 2014, 69-69.
- 김재현, 문흥규, 박재인, 김만조 (1986). 피나무(*Tilia amurensis*)의 유엽(幼葉)을 이용한 체세포배 형성. 한국임학회지 72, 64-65.
- 부다운과 박선주 (2016). 한국산 피나무속(*Tilia* L.) 식물의 분자계통학적 연구, 한국자원식물학회지 29, 547-554.
- 윤택승, 임지영, 김종진 (2005). 용기의 형태와 용적에 따른 찰피나무 유묘의 생장. 시설원예식물공장 14, 239-244.
- 이덕수 (1995). 피나무種子의 休眠과 發芽促進法에 關한 研究. 건국대학교 대학원 논문집 40, 339-346.
- 이돈구, 서민환 (1989). 삽목에 의한 피나무류의 증식. 한국양봉학회지 4, 56-60.
- 이임균, 하시연, 이선화 (2018). 2017 산림과학연구 주요성과. 국립산림과학원. 서울. 79p.
- 조민석, 황재홍, 양아람, 김석권 (2013a). 시설양묘과정에서 용기 종류에 따른 피나무의 생장 특성. 한국산림휴양학회 학술발표회 자료집 2013, 1012-1014.
- 조민석, 황재홍, 양아람, 이상길 (2013b). 학술연구논문 포스터발표 : 1분과: 산림환경, 산림생태, 수목학, 분류, 조림 ; 생육상토에 따른 피나무 용기묘의 생리 및 생장 특성. 한국임학회 하계총회 학술발표회 2013, 50-52.
- 최문길, 이근수 (1982). 피나무 역위근삽(逆位根插)에 대하여. 한국임학회지 55, 84-84.
- 홍성천 (2000). 임목종자의 발아형(發芽形)과 육묘도(育苗圖)에 대하여 - 피나무류, 음나무, 주목을 중심으로. 한국양묘협회지 28, 32-57.

- 홍성천 (2002). 임업 정책과 밀원식물의 미래. 한국양봉학회 학술대회 자료집, 85-100.
- 황재홍, 조민석, 양아람, 이상길 (2013). 학술연구논문 포스터발표 : 1분과: 산림환경, 산림생태, 수목학, 분류, 조림 ; 시비가 피나무 용기묘의 생리 및 생장 특성에 미치는 영향. 한국임학회 하계총회 학술발표회 2013, 48-49.
- Aichinger, E., Villar, C. B., Di Mambro, R., Sabatini, S., and Kohler, C. (2011). The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the Arabidopsis root. *Plant Cell* 23, 1047-1060.
- Albrecht, C., Russinova, E., Kemmerling, B., Kwaaitaal, M., and de Vries, S. C. (2008). Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. *Plant Physiol* 148, 611-619.
- Bapat, V., and Rao, P. (1979). Somatic embryogenesis and plantlet formation in tissue cultures of sandalwood (*Santalum album* L.). *Annals of Botany* 44, 629-630.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., van Lammeren, A. A., and Miki, B. L. (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell* 14, 1737-1749.
- Braybrook, S. A., Stone, S. L., Park, S., Bui, A. Q., Le, B. H., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., and Harada, J. J. (2006). Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3468-3473.
- Chalupa, V. (1985). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Commun. Inst. For. Czech* 14, 57-63.
- Chalupa, V. (1990). Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Rep* 9, 398-401.
- Chalupa, V., and Durzan, D. (1973). Growth and development of resting buds of conifers in vitro. *Canadian Journal of Forest Research* 3, 196-208.
- Corredoira, E., Ballester, A., Ibarra, M., and Vieitez, A. (2015).

- Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. *Tree physiology* 35, 678–690.
- Corredoira, E., Valladares, S., Martinez, M. T., Vieitez, A. M., and Jose, M. C. S. (2013). Somatic embryogenesis in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Trees—Structure and Function* 27, 1597–1608.
- Cuenca, B., San-Jose, M., Martinez, M. T., Ballester, A., and Vieitez, A. M. (1999). Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. *Plant Cell Reports* 18, 538–543.
- Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., and Vachon, G. (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136, 3660–3669.
- Dean Rider, S., Jr., Henderson, J. T., Jerome, R. E., Edenberg, H. J., Romero-Severson, J., and Ogas, J. (2003). Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant J* 35, 33–43.
- Durzan, D., and Steward, F. (1968). Cell and tissue culture of white spruce and jack pine. *Bimonthly Res. Notes* 24.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- El-Mahrouk, M. E., Dewir, Y. H., and Omar, A. M. K. (2010). In Vitro Propagation of Adult Strawberry Tree (*Arbutus Unedo* L.) through Adventitious Shoots and Somatic Embryogenesis. *Propagation of Ornamental Plants* 10, 93–98.
- Finer, J. J. (1995). Direct Somatic Embryogenesis. In "Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods" (O. L. Gamborg and G. C. Phillips, eds.), pp. 91–102. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Fineschi, S., Salvini, D., Turchini, D., Carnevale, S., and Vendramin, G. G. (2003). Chloroplast DNA variation of *Tilia cordata* Mill. (Tiliaceae). *Canadian journal of forest research* 33, 2503–2508.
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to

- Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43, 27–47.
- Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J., and Lemaux, P. G. (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* 222, 977–988.
- Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., and Su, Z. H. (2016). Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Front Plant Sci* 7, 938.
- Hakman, I., Fowke, L. C., Von Arnold, S., and Eriksson, T. (1985). The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* 38, 53–59.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J.-P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U., and de Vries, S. C. (2001). The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 127, 803–816.
- Ho, K. K., Zhang, H., Golden, B. L., and Ogas, J. (2013). PICKLE is a CHD subfamily II ATP-dependent chromatin remodeling factor. *Biochim Biophys Acta* 1829, 199–210.
- Horstman, A., Bemer, M., and Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration (Oxf)* 4, 201–216.
- Ikeda-Iwai, M., Satoh, S., and Kamada, H. (2002). Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* 53, 1575–1580.
- Karami, O., Aghavaishi, B., and Pour, A. M. (2009). Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of chemical biology* 2, 177–190.
- Karkonen, A. (2000). Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61, 205–214.
- Karlin, S., and Altschul, S. F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2264–2268.

- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J., and de Vries, S. (2006). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* 18, 626–638.
- Kim, T. D., Choi, Y. E., Lee, B. S., Kim, Y. J., Kim, T. S., and Kim, I. S. (2006). Micropropagation of *Tilia amurensis* via Repetitive Secondary Somatic Embryogenesis. *Journal of Plant Biotechnology* 33, 243–248.
- Kim, T. D., Lee, B. S., Kim, T. S., and Choi, Y. E. (2007). Developmental plasticity of glandular trichomes into somatic embryogenesis in *Tilia amurensis*. *Ann Bot* 100, 177–183.
- Kim, Y.-W. (2015). Initiation of embryogenic callus from mature zygotic embryos in Japanese larch (*Larix kaempferi*). *Journal of Plant Biotechnology* 42, 223–227.
- Li, X., Han, J. D., Fang, Y. H., Bai, S. N., and Rao, G. Y. (2017). Expression Analyses of Embryogenesis-Associated Genes during Somatic Embryogenesis of *Adiantum capillus-veneris* L. In vitro: New Insights into the Evolution of Reproductive Organs in Land Plants. *Front Plant Sci* 8, 658.
- Liqiang, M., Yingnan, L., and Fujuan, F. (2006). Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Tilia amurensis*. *Scientia Silvae Sinicae* 42, 26–31.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Ma, J., He, Y., Hu, Z., Xu, W., Xia, J., Guo, C., Lin, S., Chen, C., Wu, C., and Zhang, J. (2014). Characterization of the third SERK gene in pineapple (*Ananas comosus*) and analysis of its expression and autophosphorylation activity in vitro. *Genet Mol Biol* 37, 530–539.
- Magherini, R. (1994). Propagation of selected *Tilia* spp. by seed and semi-hardwood cuttings. *Advances in Horticultural Science* 8, 91–96.
- Magherini, R., and Nin, S. (1992a). Experiments on seed germination of some *Tilia* spp. *Acta Horticulturae* 331, 251–258.
- Magherini, R., and Nin, S. (1992b). Research on rooting of selected *Tilia* spp. *Acta Horticulturae* 331, 259–264.

- Mahmoud, K. B., Delporte, F., Muhovski, Y., Elloumi, N., Jemmali, A., and Druart, P. (2013). Expression of PiABP19, Picdc2 and PiSERK3 during induction of somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). *Molecular biology reports* 40, 1569–1577.
- Maillot, P., Lebel, S., Schellenbaum, P., Jacques, A., and Walter, B. (2009). Differential regulation of SERK, LEC1–Like and Pathogenesis–Related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 743–752.
- McCarthy, D. M., and Mason–Gamer, R. J. (2016). Chloroplast DNA–Based Phylogeography of *Tilia americana* (Malvaceae). *Systematic botany* 41, 865–880.
- Montalban, I. A., De Diego, N., and Moncalean, P. (2012). Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 451–460.
- Montalban, I. A., Garcia–Mendiguren, O., Goicoa, T., Ugarte, M. D., and Moncalean, P. (2015). Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *New Forests* 46, 309–317.
- Mordhorst, A. P., Toonen, M. A., de Vries, S. C., and Meinke, D. (1997). Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 535–576.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473–497.
- Nic–Can, G. I., Lopez–Torres, A., Barredo–Pool, F., Wrobel, K., Loyola–Vargas, V. M., Rojas–Herrera, R., and De–la–Pena, C. (2013). New insights into somatic embryogenesis: leafy cotyledon1, baby boom1 and WUSCHEL–related homeobox4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One* 8, e72160.
- Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., and Somerville, C. (1999). PICKLE is a CHD3 chromatin–remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13839–13844.

- Pearson, W. (2013). An Introduction to Sequence Similarity ("Homology") Searching. *Curr. Protoc. Bioinform* 42, 3.1.1–3.1.8.
- Perez–Nunez, M., Souza, R., Sáenz, L., Chan, J., Zuniga–Aguilar, J., and Oropeza, C. (2009). Detection of a SERK–like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant cell reports* 28, 11–19.
- Perez, M., Canal, M. J., and Toorop, P. E. (2015). Expression analysis of epigenetic and abscisic acid–related genes during maturation of *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 121, 353–366.
- Prakash, M. G., and Gurumurthi, K. (2010). Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100, 13–20.
- Quiroz–Figueroa, F. R., Rojas–Herrera, R., Galaz–Avalos, R. M., and Loyola–Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86, 285–301.
- Radoeva, T., and Weijers, D. (2014). A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science* 19, 709–716.
- Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E., and Visser, R. G. F. (1995). Secondary Somatic Embryogenesis and Applications in Plant–Breeding. *Euphytica* 81, 93–107.
- Rao, P. (1965). In vitro induction of embryonal proliferation in *Santalum album* L. *Phytomorphology* 15, 175–179.
- Rupps, A., Raschke, J., Rummler, M., Linke, B., and Zoglauer, K. (2016). Identification of putative homologs of *Larix decidua* to BABYBOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), WUSCHEL–related HOMEBOX2 (WOX2) and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR–like KINASE (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta* 243, 473–88.
- Schmidt, L., Duh, F.–M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., and Dean, M. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto–oncogene in papillary renal carcinomas.

Nature genetics 16, 68.

- Steward, F., Mapes, M. O., and Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 705–708.
- Suzuki, M., and McCarty, D. R. (2008). Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Curr Opin Plant Biol* 11, 548–553.
- Suzuki, M., Wang, H. H., and McCarty, D. R. (2007). Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiol* 143, 902–11.
- Turgut, K., Barghchi, M., and Scott, R. (1998). Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding* 117, 503–504.
- Wang, H., Caruso, L. V., Downie, A. B., and Perry, S. E. (2004). The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *The Plant Cell* 16, 1206–1219.
- Waris, H. (1957). A striking morphogenetic effect of amino acid in seed plant. *Suom Kemistil B* 30, 121.
- Yang, C., Zhao, T., Yu, D., and Gai, J. (2011). Isolation and Functional Characterization of a SERK Gene from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Molecular Biology Reporter* 29, 334–344.
- Zuo, J., Niu, Q. W., Frugis, G., and Chua, N. H. (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 30, 349–359.

APPENDIX 1. BLAST result of *putative-TaSERK*

species	gene	Accession	Identity(%)	E-value	score
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908015.1	96.017	0	776
<i>Herrania umbratica</i>	<i>SERK3</i>	XM_021435104.1	96.017	0	776
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XR_002692351.1	96	0	773
<i>Theobroma cacao</i>	<i>SERK3</i>	XM_018116033.1	95.807	0	771
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017760749.1	95.388	0	760
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017760748.1	95.388	0	760
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022869885.1	95.178	0	754
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022869884.1	95.178	0	754
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016883916.1	95.178	0	754
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016824488.1	95.178	0	754
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016824487.1	95.178	0	754
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016824486.1	95.178	0	754
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012603725.1	95.178	0	754
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012603724.1	95.178	0	754
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012603723.1	95.178	0	754
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XR_002692352.1	94.759	0	743
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908024.1	94.759	0	743
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908023.1	94.759	0	743
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908022.1	94.759	0	743
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	NM_001326866.1	94.759	0	743
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908025.1	94.737	0	739
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908017.1	94.549	0	737
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908016.1	94.549	0	737
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908018.1	94.526	0	734
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017762739.1	93.92	0	721
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012624504.1	93.501	0	710
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	NM_001326878.1	93.501	0	710
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	NM_001327440.1	93.501	0	710
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017778141.1	93.291	0	704
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012603726.1	93.291	0	704
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012606741.1	92.872	0	693
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016849141.1	92.662	0	688
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	NM_001327159.1	92.034	0	671
<i>Theobroma cacao</i>	genome assembly	LT594789.1	95.739	1E-180	643

species	gene	Accession	Identity(%)	E-value	score
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017762743.1	90.566	4E-176	628
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017762742.1	90.566	4E-176	628
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017762741.1	90.566	4E-176	628
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016819887.1	90.566	4E-176	628
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XR_001683101.1	90.147	6E-174	621
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016819160.1	90.147	6E-174	621
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012606742.1	90.147	6E-174	621
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016849143.1	90.147	8E-173	617
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016849142.1	90.147	8E-173	617
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERKL1</i>	KM384767.1	90.147	8E-173	617
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	NM_001327160.1	90.147	8E-173	617
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017762738.1	89.937	3E-172	616
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017762737.1	89.937	3E-172	616
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XR_001867944.1	89.937	3E-172	616
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_017762736.1	89.937	3E-172	616
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XR_001129736.1	89.937	4E-171	612
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012606743.1	89.937	4E-171	612
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_012601112.1	95.065	2E-169	606
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016846526.1	94.545	4E-166	595
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016823354.1	94.545	4E-166	595
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016900035.1	94.545	4E-166	595
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016897603.1	94.545	4E-166	595
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016865889.1	94.545	4E-166	595
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908027.1	94.531	1E-165	593
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>chromosome D12</i>	CP023742.1	94.286	2E-164	590
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016851351.1	94.286	2E-164	590
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908026.1	94.488	6E-164	588
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908021.1	94.271	6E-164	588
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016851673.1	94.026	8E-163	584
<i>Durio zibethinus</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_022908019.1	94.226	3E-162	582
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016851715.1	93.766	4E-161	579
<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_021779694.1	88.075	8E-158	568
<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_021779693.1	88.075	8E-158	568
<i>Quercus suber</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_024055514.1	87.448	8E-153	551
<i>Ricinus communis</i>	<i>SERK3</i>	XR_001535302.1	87.448	8E-153	551
<i>Ricinus communis</i>	<i>SERK3</i>	XM_002520315.2	87.448	8E-153	551

species	gene	Accession	Identity (%)	E-value	score
<i>Juglans regia</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_018995464.1	87.029	2E-149	540
<i>Juglans regia</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_018995463.1	87.029	2E-149	540
<i>Prunus mume</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_008220671.2	87.002	6E-149	538
<i>Prunus salicina</i>	<i>protein kinase</i>	JX308798.1	87.002	6E-149	538
<i>Prunus avium</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_021970467.1	86.792	3E-147	532
<i>Carica papaya</i>	<i>SERK3</i>	XM_022031264.1	86.583	1E-145	527
<i>Manihot esculenta</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_021753358.1	86.402	2E-144	523
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_010659320.2	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_019223779.1	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_019223778.1	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_019223777.1	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_019223776.1	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XR_002031343.1	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XR_002031342.1	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XR_002031341.1	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_010659312.2	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_010659314.2	86.373	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_002262662.4	86.402	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_019223655.1	86.402	6E-144	521
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>hypothetical protein (PHAVU)</i>	XM_007148370.1	86.402	6E-144	521
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_010659319.2	86.345	2E-143	520
<i>Vitis vinifera</i>	<i>SERK3</i>	XM_010659318.2	86.345	2E-143	520
<i>Quercus suber</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_024055525.1	86.316	8E-143	518
<i>Ziziphus jujuba</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016037914.1	86.192	8E-143	518
<i>Ziziphus jujuba</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_016037913.1	86.192	8E-143	518
<i>Malus x domestica</i>	<i>SERK3</i>	XM_008354603.2	86.164	3E-142	516
<i>Jatropha curcas</i>	<i>SERK3</i>	XM_012224680.2	86.042	4E-141	512
<i>Malus x domestica</i>	<i>SERK3-like</i>	XM_008340992.2	85.954	4E-141	512
<i>Pyrus bretschneideri</i>	<i>x SERK3-like</i>	XM_009364225.2	85.744	6E-139	505
<i>Glycine max</i>	<i>SERK</i>	XM_006584394.2	85.774	6E-139	505

APPENDIX 2. BLAST result of *putative-TaPICKLE*

species	gene	Accession	Identity(%)	E-value	score
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XR_002691666.1	95.222	2E-126	462
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_022898727.1	95.222	2E-126	462
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_022898726.1	95.222	2E-126	462
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_022898725.1	95.222	2E-126	462
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_022898724.1	95.222	2E-126	462
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_022898723.1	95.222	2E-126	462
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_022876888.1	95.172	1E-124	457
<i>Theobroma cacao</i>	<i>PICKLE</i>	XM_018127321.1	94.891	8E-116	427
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016812494.1	92.414	3E-110	409
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_012594700.1	92.014	2E-107	399
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_012594699.1	92.014	2E-107	399
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_012594698.1	92.014	2E-107	399
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_017764063.1	91.724	6E-107	398
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_017764062.1	91.724	6E-107	398
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016818466.1	91.724	6E-107	398
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016818465.1	91.724	6E-107	398
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016818464.1	91.724	6E-107	398
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016889142.1	90.816	5E-103	385
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016889141.1	90.816	5E-103	385
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016889140.1	90.816	5E-103	385
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_012594630.1	90.816	5E-103	385
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_012594544.1	90.816	5E-103	385
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_012594474.1	90.816	5E-103	385
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_017747905.1	90.136	1E-99	374
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_017747897.1	90.136	1E-99	374
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_017747888.1	90.136	1E-99	374
<i>Durio zibethinus</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_022894576.1	92.975	5E-93	351
<i>Theobroma cacao</i>	genome assembly, chromosome 9	LT594796.1	94.348	5E-93	351
<i>Gossypium raimondii</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_012594701.1	91.736	1.8E-87	333
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_017764064.1	91.393	6.6E-87	331
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PICKLE-like</i>	XM_016818467.1	91.393	6.6E-87	331
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>PICKLE</i>	XM_024590415.1	84.983	1.1E-74	291
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>PICKLE</i>	XM_024590414.1	84.983	1.1E-74	291
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>PICKLE</i>	XM_024590413.1	84.983	1.1E-74	291

species	gene	Accession	Identity(%)	E-value	score
<i>Populus euphratica</i>	PICKLE	XM_011038352.1	84.642	5.2E-73	285
<i>Populus euphratica</i>	PICKLE	XM_011038351.1	84.642	5.2E-73	285
<i>Citrus clementina</i>	PICKLE	XM_024178554.1	83.959	2.4E-71	279
<i>Ricinus communis</i>	PICKLE	XM_002515399.2	84.3	2.4E-71	279
<i>Citrus sinensis</i>	PICKLE	XM_006483393.2	83.959	2.4E-71	279
<i>Citrus sinensis</i>	PICKLE	XM_006483392.2	83.959	2.4E-71	279
<i>Jatropha curcas</i>	PICKLE	XM_012221062.2	83.959	1.1E-69	274
<i>Hevea brasiliensis</i>	PICKLE-like	XM_021785151.1	83.618	5.2E-68	268
<i>Quercus suber</i>	PICKLE	XM_024025457.1	83.392	1.1E-64	257
<i>Manihot esculenta</i>	PICKLE-like	XM_021741015.1	83.217	1.5E-63	254
<i>Vitis vinifera</i>	PICKLE	XM_002282882.4	82.927	1.5E-63	254
<i>Prunus mume</i>	PICKLE	XM_008222472.1	81.164	1.2E-54	224
<i>Prunus persica</i>	PICKLE	XM_020567165.1	80.479	2.5E-51	213
<i>Prunus persica</i>	PICKLE	XM_020567162.1	80.479	2.5E-51	213
<i>Vitis vinifera</i>	whole genome shotgun sequence	AM468251.1	82	1.2E-49	207
<i>Momordica charantia</i>	PICKLE	XM_022281557.1	79.725	5.4E-48	202
<i>Momordica charantia</i>	PICKLE	XM_022281549.1	79.725	5.4E-48	202
<i>Prunus avium</i>	PICKLE	XM_021965211.1	79.11	1.2E-44	191
<i>Solanum tuberosum</i>	PICKLE	XM_015311425.1	76.351	5.5E-33	152
<i>Solanum tuberosum</i>	PICKLE	XM_015311424.1	76.351	5.5E-33	152
<i>Solanum tuberosum</i>	PICKLE	XM_015311423.1	76.351	5.5E-33	152
<i>Solanum tuberosum</i>	PICKLE	XM_006353599.2	76.351	5.5E-33	152
<i>Solanum pennellii</i>	PICKLE	XM_015223731.1	74.747	3.3E-25	126
<i>Solanum pennellii</i>	PICKLE	XM_015223729.1	74.747	3.3E-25	126
<i>Solanum pennellii</i>	PICKLE	XM_015223728.1	74.747	3.3E-25	126
<i>Solanum pennellii</i>	PICKLE	XM_015223727.1	74.747	3.3E-25	126
<i>Solanum lycopersicum</i>	PICKLE	XM_019214383.1	74.411	1.6E-23	121
<i>Solanum lycopersicum</i>	PICKLE	XM_019214382.1	74.411	1.6E-23	121
<i>Solanum lycopersicum</i>	PICKLE	XM_019214381.1	74.411	1.6E-23	121
<i>Solanum lycopersicum</i>	PICKLE	XM_010324432.2	74.411	1.6E-23	121

APPENDIX 3. BLAST result of *putative-TaVAL1*

species	gene	Accession	Identity (%)	E-value	score
<i>Theobroma cacao</i>	<i>VAL1</i>	XM_018128123.1	89.732	6E-169	604
<i>Theobroma cacao</i>	<i>VAL1</i>	XM_018128122.1	89.732	6E-169	604
<i>Theobroma cacao</i>	<i>VAL1</i>	XM_007017024.2	89.732	6E-169	604
<i>Herrania umbratica</i>	<i>B3 domain – containing protein</i>	XM_021422488.1	89.391	2E-164	590
<i>Durio zibethinus</i>	<i>VAL1-like</i>	XM_022876433.1	87.277	1E-150	544
<i>Durio zibethinus</i>	<i>VAL1-like</i>	XM_022876434.1	86.696	3E-146	529
<i>Durio zibethinus</i>	<i>VAL1-like</i>	XM_022876432.1	86.696	3E-146	529
<i>Durio zibethinus</i>	<i>VAL1-like</i>	XM_022876431.1	86.696	3E-146	529
<i>Theobroma cacao</i>	<i>genome assembly, chromosome 9</i>	LT594796.1	87.126	5E-110	409

Abstract

Detecting and Expression of Somatic Embryogenesis Regulatory Genes in *Tilia amurensis*, *Tilia insularis* and *Tilia mandshurica*

Kang, Hae-In

Forest Environmental Science

The Graduate School

Seoul National University

Genus *Tilia* is in high demand as honey trees or landscape plants. However, seedling production of *Tilia* spp. is regarded difficult because of low germination rate. Somatic embryo (SE) is an embryo induced from epidermis cells or embryogenic somatic cells. Somatic embryogenesis is simple to be induced and enable to be used for artificial seeds. Therefore, somatic embryogenesis could be used for mass propagation of *Tilia* spp. as an alternative propagation system. While previous researches regarding somatic embryogenesis have been conducted for development of inducible condition, there has not been much research on genetics about *Tilia* somatic embryogenesis. If we could regulate the somatic embryogenesis of forest trees, it would be beneficial for mass propagation. Hence, it is necessary to define unknown mechanism of somatic embryogenesis of *Tilia* spp.

In this research, I studied whether the induction condition of *T. insularis* and *T. mandshurica* was identical to that of *T. amurensis*. Also, seven genes which were known to be associated with SE development were tested for their existence in *T. amurensis* genome. Then expressions of detected genes throughout SE development were measured. For the study, immature embryos of *T. amurensis* Rupr., *T. insularis* Nakai and *T. mandshurica* Rupr. et Maxim. dissected from seeds were cultured on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D. Total RNA was isolated from SE on different developmental stages and cDNA was synthesized. Seven primers from reference species were used in polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of amplified DNA fragment was performed. Then gene-specific primers were designed and real time qPCR were performed for expression analysis. Changes in gene expression among SE developmental stages were analyzed by analysis of variance (ANOVA). As a result, SE were developed to cotyledonary stage, the final stage of somatic embryogenesis in *T. amurensis* and *T. insularis*. SE of globular stage was induced in *T. mandshurica*. Partial sequences of putative homologs of *SERK*, *PICKLE* and *VAL1* of *T. amurensis* were identified. The genes were referred to as *pTaSERK*, *pTaPICKLE* and *pTaVAL1*. As BLAST results, the genes showed strong similarities to these of species which are taxonomically close to *T. amurensis*. When translated sequences were compared to those of arabidopsis, poplar, soybean and cork oak, *SERK*, *PICKLE* and *VAL1* showed 97.1%, 87.6,% and 68.8% similarity, respectively. The expression of *pTaSERK* was the highest at the heart stage in *T.*

amurensis and *T. insularis*, while, *pTaPICKLE* was expressed high at heart stage and low at torpedo stage in *T. amurensis*. The gene expressions at all stages in *T. insularis* were similar to the control. *pTaVAL1* expressed in *T. amuerensis* showed high expression at hearth stage and cotyledonary stage, while the expressions of all stages in *T. insularis* were equal to or lower than the control. According to results of sequencing and gene expression analysis, *pTaSERK*, *pTaPICKLE* and *pTaVAL1* genes had homology to other species genes, hence it could be assumed that these genes have similar roles in somatic embryogenesis. However, the expression pattern was different from other reference researches, so we need to perform further study regarding the function of the genes and proteins involved in somatic embryogenesis.

Keywords : *Tilia amurensis*, *Tilia insularis*, *Tilia mandshrica*, somatic embryogenesis, gene detecting, gene expression

Student Number : 2016–28580